

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANGELITA APARECIDA BERNAL

EVOLUÇÃO DOS CARACTERES ANATÔMICOS EM SPIRANTHINAE COM
ÊNFASE NOS CLADOS: EPÍFITO, *PELEXIA* E *STENORRHYNCHOS*
(ORCHIDACEAE)

CURITIBA

2013

ANGELITA APARECIDA BERNAL

EVOLUÇÃO DOS CARACTERES ANATÔMICOS EM SPIRANTHINAE COM
ÊNFASE NOS CLADOS: EPÍFITO, *PELEXIA* E *STENORRHYNCHOS*
(ORCHIDACEAE)

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Botânica, no Curso
de Pós-Graduação em Botânica, Departamento de
Botânica da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Cleusa Bona
Co-orientador: Prof. Dr. Eric de Camargo Smidt

CURITIBA

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Botânica



**“EVOLUÇÃO DOS CARACTERES ANATÔMICOS EM
SPIRANTHINAE COM ÊNFASE NOS CLADOS EPÍFITO,
PELEXIA E STENORRHYNCHOS (ORCHIDACEAE)”**

por

ANGELITA APARECIDA BERNAL

Dissertação aprovada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre no Programa
de Pós-Graduação em Botânica, pela Comissão
formada pelos Professores

Profª Drª Cleusa Bona (UFPR)- PRESIDENTE

Profª Drª Aline Oriani Maganhato (UNESP)

Profª Drª Barbara Baêso Moura (UFPR)

Curitiba, 21 de junho de 2013.

Centro Politécnico – Jardim das Américas - Caixa Postal 19031 – CEP: 81531-990 – Curitiba/PR
Telefones: (41) 3361-1625 – pgbotanica.ufpr@gmail.com
Site: www.ppgbotanica.ufpr.br Facebook: <http://www.facebook.com/pgbotanica.ufpr>

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem Ele nada seria possível.

À minha orientadora, Profa. Dra. Cleusa Bona, pela orientação, competência, prontidão e pela amizade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Eric de Camargo Smidt, pela orientação, confiabilidade, competência e objetividade.

Ao Curso de Pós-Graduação em Botânica, e ao Laboratório de Botânica Estrutural do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná.

Ao programa PNDB/CAPES pelo financiamento do projeto e concessão de bolsa.

A Profa. Dra. Erika Amano, pelas dicas e orientações.

Ao funcionário Nilson Belém Filho, pela colaboração nos trabalhos de laboratório.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica (Diretores e funcionários) pelo uso dos laboratórios e equipamentos para análise em MEV.

A todas as pessoas que, de certa forma, colaboraram para realização deste trabalho.

RESUMO

A família Orchidaceae está distribuída em cinco subfamílias, sendo as Orchidoideae subdivididas em sete tribos. Destas, a tribo Cranichideae (Lindl.) Endl. compreende aproximadamente 90 gêneros posicionados sistematicamente em seis subtribos. Embora a classificação sistemática das subfamílias pareça estar claramente resolvida, o mesmo não se aplica em níveis de tribo e subtribo. A subtribo Spiranthinae com, aproximadamente 40 gêneros, apresenta sua delimitação sistemática não resolvida. Este trabalho tem por objetivo identificar e utilizar os caracteres anatômicos para inferir relações filogenéticas entre as espécies da Subtribo Spiranthinae (tribo Cranichideae) com ênfase no clado epífito (*Eurystyles/Lankesterella*) e nos Clados *Pelexia* e *Stenorrhynchos*. Foram analisadas cinco espécies do grupo epífito e 33 terrestres, divididas entre os clados *Pelexia* e *Stenorrhynchos* e seis espécies/seis gêneros para o grupo externo. Para o levantamento das características anatômicas foram analisados raiz, folha, escapo e superfície floral, utilizando-se técnicas convencionais para microscopia de luz e eletrônica de varredura. Para a análise filogenética do grupo epífito foi feito somente a filogenia morfológica e para os clados *Pelexia* e *Stenorrhynchos* foi feita análise filogenética combinada (morfológica + ITS). Os órgãos vegetativos das espécies do grupo epífito apresentam maior número de sinapomorfias do que as peças florais. A anatomia revelou caracteres de valor diagnóstico, indicando que o grupo epífito é monofilético e que *Eurystyles* (*Pseudoeurystyles*) *lorenzii* (Hoehne) Szlach. é grupo irmão do clado *Eurystyles/Lankesterella*. Vários caracteres anatômicos dos clados *Pelexia* e *Stenorrhynchos* considerados sinapomórficos foram observados neste estudo, como velame do tipo spiranthes, tilossomo lamelado e espirantossomo. Novos caracteres diagnósticos como, cutícula verrucosa e células epidérmicas aquíferas da folha e caracteres do escapo floral como tricomas e o tipo de estelo, também foram identificados. A análise filogenética combinada foi de importância significativa para a sistemática do grupo corroborando com a monofilia do clado *Pelexia* e da subtribo Spiranthinae.

Palavras-chave: anatomia, escapo, filogenia, folha, raiz, sistemática.

ABSTRACT

The Orchidaceae is distributed into five subfamilies, and the Orchidoideae is divided in seven tribes. Cranichideae (Lindl.) Endl. comprise about 90 genera placed systematically in six subtribes. Although the systematic classification of the subfamilies appears to be clearly resolved, the same does not apply in tribe and subtribe levels. The subtribe Spiranthinae with approximately 40 genera presents unresolved systematic. This study aimed to identify anatomical features useful as taxonomic markers to infer phylogenetic relationships between species of subtribe Spiranthinae (tribe Cranichideae) with emphasis in the clades: epiphytic (*Eurystyles/Lankesterella*), *Pelexia* and *Stenorrhynchos*. Were analyzed five species of the epiphytic group and 33 of the terrestrial group and six species/genera for six outgroup. To survey the anatomical characteristics were analyzed roots, leaves, scapes and floral surface, using standard techniques for light microscopy and scanning electron microscopy. The phylogenetic analysis of the epiphytic group was performed only with morphological characters and for *Pelexia* and *Stenorrhynchos* clades analysis was performed by combined analysis (ITS + morphology). Vegetative organs of the epiphytic species have a higher number of synapomorphies than the floral parts. The anatomy revealed characters with diagnostic value, indicating that the epiphytic group is monophyletic and that *Eurystyles (Pseudoeurystyles) lorenzii* (Hoehne) Szlach. is sister group of the clade *Eurystyles/Lankesterella*. The following anatomical characters of *Pelexia* and *Stenorrhynchos* clades were considered synapomorphies: velamen of spiranthes type, lamellate tilosome and spirantosome. New diagnostic characters as warty cuticle, aquifers epidermal cells and characters of floral scape as trichomes and type of stele were also identified. The combined phylogenetic analysis was of significant importance for the systematics of the group corroborating the monophyly of the clade *Pelexia* and subtribe Spiranthinae.

Key-words: anatomy, phylogeny, leaf, root, scape, systematic.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	7
REFERÊNCIAS.....	11
2 CAPÍTULO I.....	14
3 INTRODUÇÃO	15
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1 Espécies estudadas	16
4.2 Microscopia de luz.....	17
4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	18
4.4 Análise Cladística.....	18
5 RESULTADOS	19
5.1 ANÁLISE ANATÔMICA.....	19
5.1.1 <i>Raiz</i>	20
5.1.2 <i>Folha</i>	22
5.1.3 <i>Escapo Floral</i>	26
5.1.4 <i>Bráctea</i>	28
5.1.5 <i>Sépalas e pétalas</i>	30
5.1.6 <i>Labelo</i>	32
5. 2 ANÁLISE CLADÍSTICA	34
6 DISCUSSÃO	37
REFERÊNCIAS.....	42
7 CAPITULO II.....	44
8 INTRODUÇÃO	45
9 MATERIAL E MÉTODOS	46
9.1 Espécies estudadas	46

9.2 Microscopia de luz.....	46
9.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	47
9.4 Análise Filogenética	48
10 RESULTADOS	50
10.1 ANÁLISE ANATÔMICA.....	50
10.1.1 <i>Raiz</i>	50
10.1.2 <i>Pecíolo/Bainha</i>	53
10.1.3 <i>Folha</i>	53
10.1.4 <i>Escapo</i>	55
10.2 ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	57
11 DISCUSSÃO	62
REFERÊNCIAS.....	70
APÊNDICES	72

1 INTRODUÇÃO GERAL

A família Orchidaceae é uma das maiores entre as fanerógamas, sendo considerada uma das mais complexas dentre as plantas floríferas, com aproximadamente 800 gêneros e 20.000 espécies (excluindo os híbridos) (DRESSLER, 1993). Agrupadas em cinco subfamílias: Apostasioideae, Cypripedioideae, Vanilloideae, Orchidoideae e Epidendroideae (PRIDGEON *et al.*, 1999).

As orquídeas são consideradas cosmopolitas, pois abrangem desde o norte da Suécia e Alasca até a Terra do Fogo (PABST & DUNGS, 1975). Podem crescer em climas frios, quentes e em regiões temperadas, sendo encontradas em maior abundância, não só em número de espécies como de variedades, nas regiões tropicais do planeta (ENGLERT, 2000).

As relações das subfamílias estão claramente resolvidas com estudos de DNA e dados morfológicos, porém o mesmo não se aplica em níveis de tribo e subtribo (PRIDGEON *et al.* 2001). Estes autores subdividiram Orchidoideae em seis tribos utilizando análise filogenética baseada, principalmente, em dados de moleculares de Kores *et al.*, (1997) e Cameron *et al.*, (1999). No entanto, permanecem vários problemas com o monofiletismo de algumas tribos.

A tribo Cranichideae (Lindl.) Endl. compreende aproximadamente 90 gêneros e 1600 espécies de, principalmente, orquídeas terrestres encontradas em todos os continentes com larga distribuição nos trópicos e subtrópicos, exceto na Antártida (DRESSLER, 1993; CHASE *et al.*, 2003; PRIDGEON *et al.*, 2003; SALAZAR *et al.*, 2003). No estudo filogenético com dados moleculares de Salazar *et al.* (2003) foram reconhecidas seis subtribos para Cranichideae (Goodyerinae, Manniellinae, Pterostylidinae, Cranichidinae, Spiranthinae e Galeottiellinae). Destas, a subtribo Spiranthinae Lindl. compreende 40 gêneros e se restringe a região neotropical, com exceção do gênero *Spiranthes* Rich. e da espécie *Cyclopogon obliquus* (J.J. Sm.) Szlach., que também são encontrados em partes do sudeste da Ásia (PRIDGEON *et al.*, 2003).

As espécies de Spiranthinae são plantas herbáceas, geralmente terrestres, rupícolas ou epífitas. As raízes são fasciculadas com velame do tipo “*spiranthes*”

(nome atribuído ao velame com uma ou duas camadas de células, com espessamento helicoidal fino e poros na parede, identificado por Porembski & Barthlott, (1988) em *Spiranthes laciniatum*). O caule é reduzido com folhas dispostas em espiral, solitárias ou formando uma roseta basal. A inflorescência é um racemo terminal com flores geralmente resupinadas, tubulares, frequentemente carnudas, coloridas e brilhantes. As sépalas são livres ou parcialmente unidas, frequentemente decorrentes no ovário, formando um esporão semelhante a um nectário. As pétalas geralmente são aderidas à sépala dorsal formando um capuz sobre a coluna e o labelo. Este apresenta margens aderidas nos lados da coluna, formando um túnel que leva ao nectário, característica considerada uma sinapomorfia para Spiranthinae (SALAZAR *et al.*, 2003). A coluna apresenta pé parcialmente ou completamente aderido ao ovário que pode ser glabro ou lanuginoso e é frequentemente torcido (PRIDGEON *et al.*, 2003).

A delimitação genérica em Spiranthinae vem sendo tratada há quase um século. Schlechter ¹ (1920 citado por PRIDGEON *et al.*, 2003) reconheceu 24 gêneros baseados em atributos florais do rostelo e viscidium. Posteriormente, três revisões genéricas de Spiranthinae foram publicadas, baseadas também em caracteres do rostelo e viscidium. A primeira, feita por Garay (1982), que reconheceu 44 gêneros. A segunda, Balogh (1982) e Burns-Balogh (1986), reconheceram somente 17 gêneros em cinco alianças genéricas e consideraram cinco gêneros como isolados. A terceira, Szlachetko (1995) desmembrou Spiranthinae em três subtribos, denominando-as de subclados. No entanto, segundo Pridgeon *et al.* (2003), Szlachetko (1995) não deixou claro quais caracteres foram utilizados e portanto esta proposta de classificação não é atualmente aceita de maneira geral pelos taxonomistas que trabalham com o grupo. Dressler (1993) apresentou um diagrama filogenético da tribo Cranichideae, mas não incluiu Manniellinae e Pachyplectroninae. Pridgeon *et al.* (2003) consideraram frágil as relações sugeridas por Dressler (1993), devido a um número baixo de caracteres para sustentar tais relações. Outros estudos também exploraram relações filogenéticas entre os gêneros de Cranichideae (BURNS-BALOGH & ROBINSON, 1983; VARGAS, 1997). ancorados em poucos caracteres de morfologia floral.

O estudo feito por Salazar *et al.* (2003), baseado em sequência nucleotídica de cinco regiões plastidiais e de DNA nuclear, mostrou que Spiranthiane (*sensu*

¹SCHLECHTER, R. Versuch einer systematischen Neuordnung der Spiranthinae. *Beibefte zum Botanischen Centralblatt*, 37, 317-454. 1920.

Dressler, 1993), excluindo o gênero *Galeottiella*, forma um grupo monofilético sustentado por um alto percentual de bootstrap. Apesar da sequência de DNA fornecer evidências de monofiletismo existem poucas sinapomorfias morfológicas evidentes para este clado, como por exemplo, a adesão das margens do labelo aos lados da coluna formando um túnel que leva ao nectário e a diferenciação apical e basal da polínia tétrade (PRIDGEON *et al.*, 2003; SALAZAR *et al.*, 2003).

Segundo Pridgeon *et al.*, (2003) a falta de sinapomorfias morfológicas não é um problema restrito a *Spiranthinae*, mas também as outras subtribos de *Cranichideae*, devido a estrutura relativamente pequena das plantas e flores e ao alto grau de homoplasias. No entanto, *Spiranthinae* pode ser genericamente distinta de outras subtribos pertencente à tribo *Cranichideae* pela combinação de raiz fasciculada, flores resupinadas e labelo aderido aos lados da coluna com nectários próximos a base (PRIDGEON *et al.*, 2003). De acordo com o estudo de sequência nucleotídica de Salazar *et al.* (2003) foram identificados quatro clados principais em *Spiranthinae* (PRIDGEON *et al.*, 2003 e SALAZAR *et al.*, 2003):

- I) *Stenorrhynchos* s.s. e outros gêneros considerados estreitamente relacionados ou combinados com os gêneros: *Eltroplectris*, *Mesadenella*, *Pteroglossa* e *Sacoila*;
- II) Aliança *Pelexia* (BURNS-BALOGH & ROBINSON 1983) e o Clado *Cyclopogoninae* (SZLACHETKO 1995), incluindo *Cyclopogon* s.l., *Pelexia*, *Sarcoglottis* e *Veyretia* mais *Odontorrhynchus* e *Coccineorchis*;
- III) *Eurystyles* e *Lankesterella*;
- IV) *Spiranthes* e outros gêneros, principalmente ou exclusivamente, diversificados no limite norte do Neotrópico.

A anatomia dentro da família *Orchidaceae* tem subsidiado estudos de cunho taxonômico, sistemático e ecológicos. Estruturas anatômicas de valor taxonômico como estrutura do velame, tilossomo e espirantossomo na raiz e elementos traqueais da nervura central na folha, foram estudadas em poucas espécies da subtribo *Spiranthinae*, pois estes estudos foram realizados em nível de tribo. Porembski & Barthlott (1988) identificaram 12 tipos de velame sendo o tipo “*spiranthes*” característico de *Spiranthinae*. Pridgeon *et al.* (1983) identificaram sete tipos de tilossomos em raízes de *Orchidaceae* e sugeriram que esta estrutura poderia caracterizar gêneros específicos e subtribos, porém não relataram nada

para Cranichideae. Figueroa *et al.* (2008) registraram pela primeira vez esta estrutura em raiz de Cranichideae, reportando dois tipos de tilossomos (baculado e lamelado) e constataram que tilossomo do tipo lamelado pode ser uma sinapomorfia para a subtribo Spiranthiane. Porém, enfatizam a necessidade de mais investigação para entendimento na relação do tipo de tilossomo e a influência da condição ambiental (seca e, água) no seu desenvolvimento. Pois, a ausência de tilossomos em espécies de Cranichideae (PRIDGEON *et al.*, 1983) parece ter sido identificada em plantas cultivadas, com abastecimento de água suficiente e sem micorrizas. Stern *et al.* (1993a, 1993b) registraram um tipo especializado de amiloplasto (espirantossomo) encontrado no córtex da raiz de várias espécies de Cranichideae e, que poderia caracterizar o grupo. Stern *et al.* (1993) sugeriram os elementos traqueais binário da nervura central como uma sinapomorfia para Cranichideae e, posteriormente, Salazar *et al.* (2003) os relataram para Diurideae. Segundo Salazar *et al.* (2003) e Figueroa *et al.* (2008) Spiranthinae ainda carece de caracteres morfológicos diagnóstico pois os trabalhos existentes foram realizados praticamente em poucos caracteres da morfologia floral.

Este trabalho tem por objetivo identificar e utilizar os caracteres anatômicos de raiz, folha, escapo e caracteres da superfície da flor para inferir relações filogenéticas entre as espécies da Subtribo Spiranthinae (tribo Cranichideae), com ênfase no clado epífito (*Eurystiles/Lankesterella*) e nos clados *Pelexia* e *Stenorrhynchos*.

REFERÊNCIAS

- BALOGH, P. Generic redefinition in subtribe Spiranthinae (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, n. 69, 1119-32, 1982.
- BURNS-BALOGH, P.; ROBINSON, H. Evolution and phylogeny of the Pelexia alliance (Orchidaceae: Spiranthoideae: Spiranthinae). **Systematic botany** 8: 263-268. 1983.
- BURNS-BALOGH, P.; FUNK, V. A phylogenetic analysis of the Orchidaceae. **Smithsonian Contributions to Botany** 61, Smithsonian institution, Washington, D. C., USA. 1986.
- CAMERON, K. M.; CHASE, M. W.; WHITTEN, W. M.; KORES, P.J.; JARREL, D. C.; ALBERT, V. A.; YUKAWA, T.; HILLS, H. G.; GOLDMAN, D. H. A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from *rbcl* nucleotide sequences. **American Journal of Botany**, New York, v.86, p. 208-224. 1999.
- CHASE, M.W.; BARRET, R.L.; CAMERON, K. M.; FREUDSTEIN, J. V. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: Dixon, k.m. (Ed): **Orchid conservation**,. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia. p. 69-89, 2003.
- DRESSLER, R. L. Phylogeny and classification of the orchid family. Portland: **Dioscorides**, 314p. 1993.
- ENGLERT, S. I. **Orquídeas e Bromélias**: manual prático de cultivo. Guaíba: Agropecuária 2000.
- FIGUEROA, C.; SALAZAR, G. A.; ZAVALA, H. A.; ENGLEMAN, E. M. Root character evolution and systematics in Cranichidinae, Prescottiinae and Spiranthinae (Orchidaceae, Cranichideae) **Annals of Botany**, n.101, p. 509-520, 2008.
- GARAY, L. A. A. Generic revision of the Spiranthinae. **Botanical Museum Leaflets** (Harvard University), 28: 277-425. 1982.
- KORES, P. J.; CAMERON, K. M.; MOLVRAY, M.; CHASE, M. W. The phylogenetic relationships of Orchidoideae and Spiranthoideae (Orchidaceae) as inferred from *rbcl* plastid sequences. **Lindleyana**, 21, p. 1-11, 1997.
- PABST, G. F. J.; DUNGS, F. **Orchidaceae brasiliensis**. Vol. I, Hildesheim: Brucke-Verlag. 1975.
- POREMBSKI, S.; BARTHLOTT. Velamen radicum micromorphology and classification of the Orchidaceae. **Nordic Journal of Botany** n.8 p. 117-137, 1988.
- PRIDGEON, A. M.; STERN, W. L.; BENZING D. H. Tilosomes in roots of orchidaceae: morphology and systematic occurrence. **American journal of botany** n.70, p. 1365-1377, 1983.

PRIDGEON, A. M., CRIBB, P., CHASE, M. e RASMUSSEN, F. N. **Genera Orchidacearum**. vol. 1. General Introduction, Apostasioideae, Cypripedioideae. Oxford University Press, New York. 1999.

PRIDGEON, A. M., CRIBB, P., CHASE, M. e RASMUSSEN, F. N. **Genera Orchidacearum**. vol. 2. Orchidoideae (Part one). Oxford University Press, New York, 416 p. 2001.

PRIDGEON, A. M.; CRIBB, F. F.; CHASE, M. W.; RASMUSSEN F. N. **Genera Orchidacearum** (volume 3) Orchidoideae (part two) Vanillaideae Royal Botanic Gardens, Kew. Oxford 2003.

SALAZAR, G. A.; CHASE, M. W.; SOTO ARENAS, M. A.; INGROUILLE, M. Phylogenetics of Cranichideae with emphasis on Spiranthinae (Orchidaceae, Orchidoideae): Evidence from plastid and nuclear DNA sequences. **American Journal of Botany** n. 90 , v.5, p. 777-795, 2003.

SZLACHETKO, D. L. **Systema orchidaliu**m- fragm. Flor. Geobot, Suppl n.3, p. 1-137, 1995.

STERN, W. L.; ALDRICH, H. C.; MCDOWELL, L. M.; MORRIS, M. W.; PRIDGEON, A. M. Amyloplasts from cortical root cells of Spiranthoideae (Orchidaceae). **Protoplasma** n.172: 49–55, 1993.

STERN, W. L.; MORRIS, M. W.; JUDD, W. S.; PRIDGEON, A. M.; DRESSLER, R. L. Comparative vegetative anatomy and systematic of Spiranthoideae (Orchidaceae). **Bot. J. Linn. Soc.** 113: 161—197, 1993.

VARGAS, C. A. **Phylogenetic analysis of Cranichideae and Prescottinae (Orchidaceae), with some taxonomic changes in Prescottiinae**. MSc thesis. University of Missouri, ST. Louis Missouri, USA. 1997.

APRESENTAÇÃO

A Dissertação sob o tema geral (Evolução dos caracteres anatômicos com ênfase nos clados epífito (*Eurystyles/Lankesterella*) e os clados *Pelexia* e *Stenorrhynchos*) foi desenvolvida em dois capítulos. O primeiro trata dos caracteres anatômicos do grupo epífito, da subtribo Spiranthinae. Este clado é composto por dois gêneros *Eurystyles* Wawra, e *Lankesterella* Ames, que apesar de alguns estudos, sua delimitação ainda não é bem definida, pois os estudos pautados somente nos padrões florais afastam sistematicamente os dois gêneros, enquanto que os baseados na forma de vida e na similaridade vegetal os aproximam. A proposta é acrescentar informações que possam auxiliar na sistemática do grupo.

O segundo capítulo tem o mesmo objetivo, porém focados nos clados *Pelexia* e *Stenorrhynchos*, também da subtribo Spiranthinae. No entanto, há várias divergências nos caracteres que os agrupam, segundo Salazar *et al.* (2003). Um dos maiores gêneros é *Cyclopogon* (Clado *Pelexia*) com aproximadamente 60 espécies, com centro de dispersão no Brasil. Até o momento não há estudos de grande amplitude abordando caracteres anatômicos para este grupo. Os poucos trabalhos realizados foram desenvolvidos fora do país, em nível de Tribo e Subtribo, envolvendo um número mínimo de espécies.

Os dois capítulos foram formatados segundo as normas da revista *Annals of Botany*.

2 CAPÍTULO I

EVOLUÇÃO DOS CARACTERES ANATÔMICOS EM *EURYSTYLES* WAWRA E *LANKESTERELLA* AMES (Orchidaceae)

Contextualização e objetivo A sistemática de *Eurystyles* Wawra e *Lankesterella* Ames (grupo epífito) apresenta divergências entre os taxonomistas que se baseiam em padrões florais, com aqueles que se baseiam no hábito de vida e na morfologia vegetativa. Este estudo tem por objetivo utilizar caracteres anatômicos de valor diagnóstico para subsidiar o entendimento de relações filogenéticas do grupo.

Métodos Foram analisados caracteres anatômicos de raiz, folha, escapo e superfície das flores (brácteas, sépalas e pétalas) de nove espécies, sendo que cinco espécies integram o grupo epífito e quatro espécies/quatro gêneros (terrestres) compõem o grupo externo. A evolução de caracteres levantados baseou-se na hipótese filogenética estabelecida para o grupo. Para a análise anatômica foram utilizadas técnicas convencionais de microscopia de luz e eletrônica de varredura.

Principais resultados As características anatômicas das espécies epífitas evidenciam que o clado epífito é monofilético, fortemente sustentado (valor de bootstrap (BP) = 83 e Índice de Decaimento (ID) = 5) e pode ser reconhecido pelas seguintes sinapomorfias: altura das células da epiderme aquífera da face adaxial maior do que a espessura do mesofilo; escapo com estelo do tipo eustelo.

Conclusões Os órgãos vegetativos apresentam maior número de caracteres anatômicos diagnósticos apontando sinapomorfias, do que os caracteres levantados nas peças florais. A análise cladística baseada em caracteres anatômicos indica que o grupo epífito é monofilético e que *Eurystyles* (*Pseudoeurystyles*) *lorenzii* (Hoehne) Szlach. é grupo irmão do clado *Eurystyles/Lankesterella*.

Palavras-chave: anatomia, filogenia, folha, raiz, Spiranthinae.

3 INTRODUÇÃO

O clado epífito é constituído por *Eurystyles* Wawra e *Lankesterella* Ames e integram os 40 gêneros que compõem a subtribo Spiranthinae Lindl. (Pridgeon *et al.*, 2003). O gênero *Eurystyles* é constituído de aproximadamente 16 espécies, distribuído desde o Sudeste do México, as Grandes Antilhas e América do Sul, com exceção do Chile e Uruguai. O gênero *Lankesterella*, com aproximadamente nove espécies, ocorre desde a América Central até os países da América do Sul (Colômbia, Venezuela, Equador, Peru, Bolívia, Brasil, Paraguai e Argentina) (Pridgeon *et al.*, 2003).

As plantas desses dois gêneros são muito similares vegetativamente, consistindo de pequenas rosetas com folhas brilhantes, sempre verdes, geralmente com margens ciliadas e que persistem por várias estações de crescimento (Pridgeon *et al.*, 2003; Salazar & Dressler, 2011). As principais diferenças estão nas estruturas reprodutivas. Em *Eurystyles* as flores estão dispostas em uma espiral compondo um racemo curto (similar a um capítulo), enquanto que em *Lankesterella* a inflorescência é frouxa, constituída por um racemo unilateral com uma a quatro flores. Há também diferenças em vários detalhes estruturais das flores. Em *Eurystyles* as sépalas são infladas, a base do labelo geralmente forma duas pontas nas laterais com um lóbulo de cada lado, próximo a elas. Em *Eurystyles* subgênero *Pseudoeurystyles* (Hoehne) Szlach. o labelo é séssil e faltam os dois lóbulos. A coluna é livre e alongada e o rostelo, quando presente, normalmente forma uma superfície denteada. Em *Lankesterella* as flores são pilosas, o labelo séssil com espessamentos marginais próximos à base, a coluna é curta e rígida e o rostelo remanescente é acicular (Salazar & Dressler, 2011).

A proximidade desses dois gêneros é desconsiderada por alguns taxonomistas que avaliaram apenas caracteres florais (Balogh, 1982; Burns-Balogh *et al.*, 1985; Szlachetko, 1995). Por outro lado, taxonomistas que levaram em consideração o hábito de vida e a

morfologia vegetativa, julgaram essas características suficientes para sustentar uma relação de proximidade (Dressler, 1981; Soto-Arenas, 1993), que foi confirmada em estudos filogenéticos com dados moleculares (Salazar *et al.* 2003). Mais recentemente, outro estudo com dados moleculares (Górniak *et al.*, 2006) indicou uma relação de grupo irmão entre *Eurystyles* e *Lankesterella*. Segundo Salazar & Dressler (2011), isto foi questionado por taxonomistas de padrões florais, que consideraram o resultado pouco ortodoxo, levando em conta, que foi amostrada uma única região do DNA. Na tentativa de esclarecer as relações filogenéticas desses dois gêneros e avaliar a confiabilidade dos caracteres vegetativos versus florais, Salazar & Dressler (2011) avaliaram caracteres moleculares de 29 espécies/22 gêneros de Spiranthinae e indicaram os caracteres florais como menos confiáveis para estabelecer tais relações.

Diante das tentativas de um entendimento das relações filogenéticas entre *Eurystyles* Wawra, e *Lankesterella* Ames, este trabalho tem o objetivo de identificar os caracteres anatômicos de valor taxonômico nos órgãos vegetativos e reprodutivos para complementar os estudos de filogenia.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Espécies estudadas

Foram analisadas cinco espécies/dois gêneros integrantes do clado epífito de Spiranthinae. Do gênero *Lankesterella* foram analisadas duas espécies: um espécime de *Lankesterella caespitosa* (Lindl.) Hoehne e nove de *Lankesterella ceracifolia* (Barb. Rodr.) Mansf.. Do gênero *Eurystyles* foram analisadas três espécies, sendo um espécime de *Eurystyles actinosophila* (Barb. Rodr.) Schltr., quatro de *Eurystyles cotyledon* Wawra e um do subgênero *Eurystyles* (*Pseudoeurystyles*) *lorenzii* (Hoehne) Szlach. Conforme classificação de

Pridgeon *et al.* (2003) foram selecionados quatro espécies/quatro gêneros (Cranichideae) de plantas terrestres para o grupo externo. As espécies estudadas e os dados de coleta estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Lista dos taxa estudados, informação do voucher, órgãos analisados (R= raiz, F= folha, E= escapo floral, FL= flor) e localidades de coleta.

Taxon	Voucher	Órgãos	Localidade
Grupo Externo			
<i>Cyclopogon apricus</i> (Lindl.) Schltr.	Smidt, E. C. sn	R,F,E,FL	Brasil, Paraná, Curitiba
<i>Mesadenella cuspidata</i> (Lindl.) Garay	Smidt, E. C. 975	R,F,E,FL	Brasil, Paraná, Bocaiúva do Sul
<i>Prescottia stachyodes</i> (Sw.) Lindl.	Lemos, J. V. sn	R, F,E,FL	Brasil, Paraná, Antonina
<i>Sacoila lanceolata</i> (Aubl.) Garay.	Ceschin, F. 01	R,F,E,FL	Brasil, Paraná, Curitiba
Grupo Interno (Epífita)			
<i>Eurystyles actinosophila</i> (Barb. Rodr.) Schltr.	Cadorin, T. sn	R, F, E, FL	Brasil, Santa Catarina, Imbituba
<i>Eurystyles cotyledon</i> Wawra	Smidt, E. C. 1037	F,E,FL	Brasil, Rio de Janeiro, Petrópolis
<i>E. cotyledon</i>	Engels, M. E. 159	R, F, E, FL	Brasil, Paraná, Carambeí
<i>E. cotyledon</i>	Cadorin, T. sn	R, F, E, FL	RS
<i>E. cotyledon</i>	Engels, M. E. 159	R, F	Brasil, Paraná, Tibagi
<i>Eurystyles (Pseudoeurystyles) lorenzii</i> (Hoehne) Szlach	Smidt, E. C. 932	R, F, E, FL	Brasil, São Paulo, Caraguatatuba
<i>Lankesterella caespitosa</i> (Lindl.) Hoehne	Smidt, E. C. 1023	R, F, E, FL	Brasil, Paraná, Curitiba.
<i>Lankesterella ceracifolia</i> (Barb. Rodr.) Mansf.	Smidt, E. C. 1039	R, F, E, FL	Brasil, Paraná, Pontal do Paraná
<i>Lankesterella ceracifolia</i> (3 indivíduos)	Smidt, E. C. 1040	R, F, E, FL	Brasil, Paraná, Pontal do Paraná
<i>L. ceracifolia</i> (5 indivíduos)	Imig, D. C. 09	R, F, E	Brasil, Paraná, Curitiba

4.2 Microscopia de luz

As plantas foram coletadas diretamente no ambiente de ocorrência, fixadas em álcool etílico 70% ou FAA 50 (Johansen, 1940) e armazenadas em álcool etílico 70%. As amostras, principalmente, de raiz e escapo, foram seccionadas à mão livre, em corte transversal à altura mediana de cada órgão. O restante das amostras, principalmente folha, foi submetida à infiltração em polietilenoglicol (PEG 1500 U.S.P.) por no máximo 12 horas em estufa a 60°C.

em troca parcial (1:1-PEG + álcool etílico 70%) e quatro horas em PEG puro. Os blocos foram seccionados com 50 µm de espessura. Os cortes foram submetidos a colorações e testes histoquímicos como: safrablau (Bukatsch 1972, modificado por Kraus e Arduim, 1997), Sudan III ou IV (Sass, 1951) e teste para detecção de amido, segundo Berlyn & Miksche (1976). As lâminas foram montadas de forma semipermanentes com gelatina glicerizada 50% (Kaiser, 1880). As fotomicrografias foram feitas em microscópio Olympus com câmera SC30 para captura de imagem digital. A classificação dos grãos de amido e a classificação da espessura da cutícula (<3µm = delgada/ 3-10 µm = moderada/ >10 µm = espessa) seguiu Stern *et al.* (1993a, 1993b). Todos os apêndices epidérmicos, unicelular ou pluricelular, foram designados de tricomas uma vez que as projeções das peças florais não foram confirmadas como osmóforos (Fahn, 1990; Evert, 2006).

4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Amostras da raiz, escapo floral, folha e flor foram desidratadas em série etílica e secas via ponto crítico com CO₂; afixadas em suportes metálicos com fita de cobre adesiva; metalizadas com ouro e analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) JEOL JSM - 6360LV Scanning Electron Microscope (JEOL Ltd, Tokyo, Japan) no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

4.4 Análise Cladística

A matriz de caracteres foi construída com auxílio do programa NEXUS Editor (Page, 2001). Os caracteres foram tratados como tendo peso igual e estados não ordenados (parcimônia de Fitch) (Fitch, 1971). Na análise de máxima parcimônia, foi utilizado o programa TNT versão 1.1 (Goloboff *et al.*, 2000) através do script “*aquickie*”. Neste script

foi gerada uma árvore de consenso estrito, após busca heurística, com valores de suporte dos clados com 1000 réplicas de bootstrap (Felsenstein, 1985). Os índices das árvores resultantes foram obtidos a partir do programa TNT versão 1.1 (Goloboff *et al.*, 2000) através do *script* “stats” e pelo programa PAUP *4.0b10 (Swofford, 2003).

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE ANATÔMICA

Tricomas de vários tipos e com variações dentro do mesmo tipo foram observados. Para melhor codificá-los, foram agrupados por semelhança morfológica conforme descrição a seguir:

1. *Tricoma radicular*: tricomas unicelulares com parede contínua (lisa) ou descontínua (espiralada). Nos tricomas espiralados a parede se rompe em espiral ficando esta conectada por finas faixas perpendiculares de microfibrilas (Fig. 1A, 1B).
2. *Papila*: célula epidérmica provida de pequena projeção, com parede estriada ou lisa (Fig. 7H).
3. *Tricoma vesiculoso*: unicelular, saliente na epiderme e arredondado em forma de vesícula (Fig. 6D, 7F, 8C, D, G).
4. *Tricoma simples*: formado por uma única célula alongada, com ápice arredondado ou afilado, paredes lisas ou estriadas, base estreita ou alargada (Fig. 3B, 7D, 8A, B, E, J).
5. *Tricoma unisseriado*: formado por duas ou mais células, com extremidade afilada ou obtusa e com base alargada ou não (Fig. 3D, 5A, B, 7B).
6. *Tricoma capitado*: variável no tamanho, com cabeça unicelular arredondada e pedicelo unisseriado reto ou com base dilatada (Fig. 5C, 6B-D, 7F, H).

7. *Tricoma ramificado*: bicelular com uma única ramificação (Fig. 6A).

5.1.1 Raiz

As espécies do grupo epífita possuem tricomas cobrindo toda a superfície da raiz. Nas espécies de *Eurystyles* podem ocorrer dois tipos de tricomas, os simples e os espiralados (Fig. 1A). Nas espécies de *Lankesterella* foram registrados apenas tricomas simples (Fig. 1B). As espécies terrestres também possuem tricomas simples e espiralados, com exceção de *Sacoila lanceolata*, que não apresentou o tipo espiralado. Todas as espécies de *Lankesterella* tiveram velame uniestratificado (Fig. 1C), com células irregulares, com paredes finas sem espessamento ou com lamelas discretas na parede periclinal interna. Essas lamelas ocorrem principalmente nas paredes adjuntas às células de passagens (Fig. 1D). Velame uni ou biestratificado foi identificado em *Eurystyles* e nas espécies terrestres (Fig. 1E, F) e três camadas somente em *Prescottia stachyodes*. Tilossomo do tipo lamelado (Fig. 1G) está presente em *Eurystyles cotyledon* (epífita) e nas terrestres *Prescottia stachyodes*, *Mesadenella cuspidata* e *Cyclopogon apricus*. A exoderme das espécies de *Eurystyles*, *Mesadenella* e *Prescottia* possui espessamento de parede escalariforme (Fig. 1H), enquanto que em *Pseudoeurystyles*, *S. lanceolata*, *C. apricus* e as espécies de *Lankesterella* a exoderme tem paredes delgadas. O córtex em todas as espécies é parenquimático contendo idioblastos com ráfides e células amilíferas (Fig. 1I). Todas as espécies do gênero *Eurystyles* e as demais do grupo externo apresentam amiloplastos do tipo espirantossomo (Fig. 2A), enquanto que as do gênero *Lankesterella* possuem amiloplastos com grãos compostos (Fig. 2B). A endoderme possui paredes delgadas (Fig. 2C), providas de estrias de Caspary em todas as espécies. O número de pólos de xilema e floema varia de dois a cinco em *Lankesterella* (Fig. 2C), três a sete em *Eurystyles* e mais de cinco nas espécies terrestres.

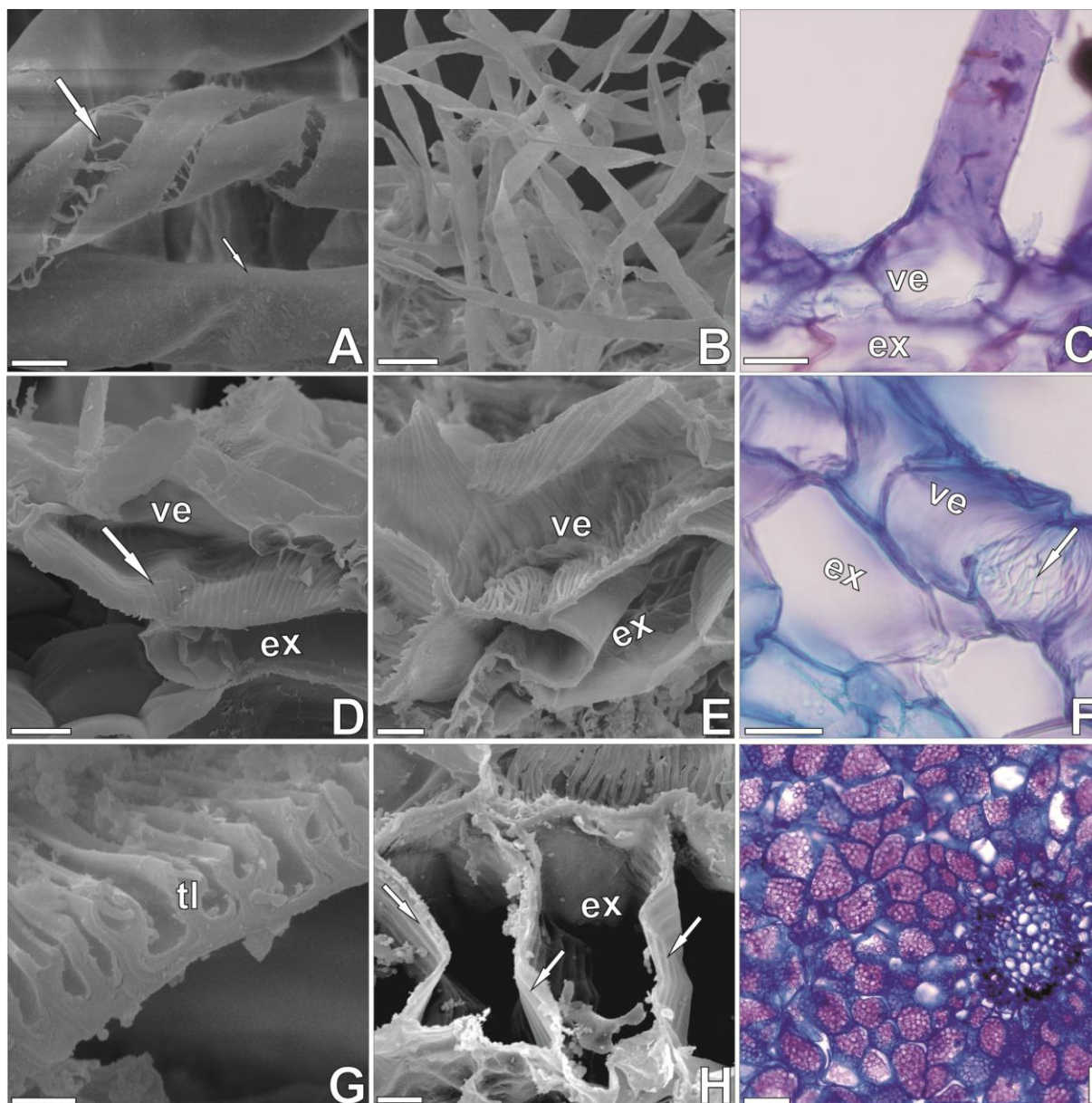


Fig. 1 Secções transversais da raiz. (A, B, D, E, G, H) em MEV e (C, F, I) microscopia de luz. (A) *Pseudoeurystyles*, tricoma simples (seta menor) e tricoma espiralado (seta maior); escala = 10 μm . (B) *Lankesterella ceracifolia*, tricomas radiculares simples; escala = 50 μm . (C) *L. ceracifolia*, velame unisseriado sem espessamento (ve) e exoderme (ex); escala = 25 μm . (D) *L. ceracifolia*, velame com leve espessamento lamelar (seta) na parede periclinal interna e exoderme (ex); escala = 10 μm . (E, F) *Eurystyles cotyledon*, velame (ve) com espessamento helicoidal e exoderme (ex); escala = 10 e 25 μm , respectivamente. (G) *Prescottia stachyodes*, tilossomo do tipo lamelado (tl); escala = 2 μm . (H) *E. actinosophila*, exoderme (ex) detalhe do espessamento escalariforme (setas); escala = 10 μm . (I) *Pseudoeurystyles*, córtex amilífero e cilindro vascular; escala = 100 μm .

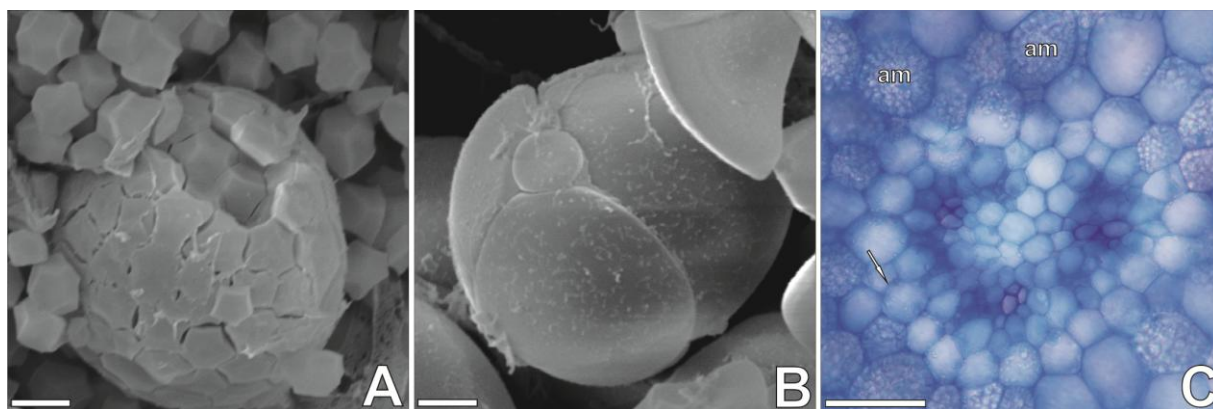


Fig. 2 Caracteres da raiz. (A, B) em MEV e (C) em microscopia de luz. (A) *Pseudoeurystyles*, espirantossomo (amiloplasto especializado); escala = 2 μm . (B) *L. ceracifolia*, grão de amido composto; escala = 2 μm . (C) *L. ceracifolia*, córtex com células amilíferas (am), endoderme de paredes delgadas (seta) e cilindro vascular com três pólos de xilema/floema; escala = 100 μm .

5.1.2 Folha

As folhas de *Lankesterella* e *Eurystyles*, apesar de apresentarem um estreitamento na base, foram consideradas sésseis, pois a anatomia dessa região apresentou características foliares (Fig. 3A). As espécies terrestres (grupo externo) e o subgênero *Pseudoeurystyles* são peciolados. A presença de tricomas simples no bordo foi registrada em todas as espécies do grupo epífita (Fig. 3B), exceto em *Pseudoeurystyles*, com papilas (Fig. 3C). *Lankesterella caespitosa* possui, na região da nervura central, tricomas longos unisseriados, com extremidade obtusa (Fig. 3D). As folhas das espécies terrestres são glabras. As espécies de *Lankesterella* e *Eurystyles* apresentam estrias epicuticulares (Fig. 3E) na face abaxial ou cutícula lisa na face adaxial. A cutícula das espécies terrestres pode ser lisa nas duas faces (*Mesadenella cuspidata*), verrucosa nas duas faces (*Prescottia stachyodes*) (Fig. 3F), verrucosa e estriada nas duas faces (*Cyclopogon apricus*) ou com cera em placas (*Sacoila lanceolata*) (Fig. 3G). As células epidérmicas de ambas as faces, em vista frontal, são poligonais com paredes anticlinais retas, tanto nas espécies epífitas quanto nas terrestres (Fig. 3H), com exceção de *P. stachyodes* em que as células da face abaxial apresentam paredes

sinuosas (Fig. 4A). A folha é hipoestomática na maioria das espécies, com exceção de *Cyclopogon apricus*, que é anfiestomática. Os estômatos variam, intraespecificamente na folha, quanto ao número de células anexas, assemelhando-se morfologicamente aos tipos, tetracítico, anisocítico, diacítico e anomocítico (Fig. 3H, 4A). A cutícula é delgada (com menos de 3µm) em todas as espécies analisadas (Fig. 4B). Epiderme aquífera típica ocorre nas duas faces, para todas as espécies do grupo epífito, com células sempre mais altas na face adaxial (Fig. 4C, D). Essa epiderme se caracteriza pelas células volumosas, geralmente mais altas do que largas, paredes periclinais e anticlinais delgadas e paredes anticlinais sinuosas ou pregueadas quando as células não estão túrgidas. Em *Lankesterella*, a altura destas células, às vezes, chega a atingir 10 vezes a espessura do mesofilo (Fig. 4D). Das espécies do grupo externo, com exceção de *C. apricus* que apresenta células epidérmicas comuns (Fig. 4E), todas as outras apresentam epiderme aquífera (Fig. 4F). O mesofilo é homogêneo com duas a quatro camadas de parênquima regular em todas as espécies epífitas (Fig. 4C, D) e também nas espécies terrestres, com 2 a 6 camadas (Fig. 4E). Porém, mesofilo heterogêneo com parênquima paliçádico foi registrado em *S. lanceolata* (Fig. 4F). A morfologia da região da nervura central, em corte transversal, é predominantemente reta nas epífitas, reentrante na face adaxial em *Pseudoeurystyles* e *Prescottia* (Fig. 4G) e proeminente na face abaxial em *Pseudoeurystyles* e *Cyclopogon* (Fig. 4G). Os feixes vasculares são colaterais, envolvidos por bainha parenquimática e dispostos linearmente no mesofilo. Xilema binário é predominante nas espécies (Fig. 4H), podendo ocorrer também xilema unitário ou trinário como registrado em *Pseudoeurystyles* (Fig. 4I). Idioblastos com ráfides foram registrados para todas as espécies analisadas.

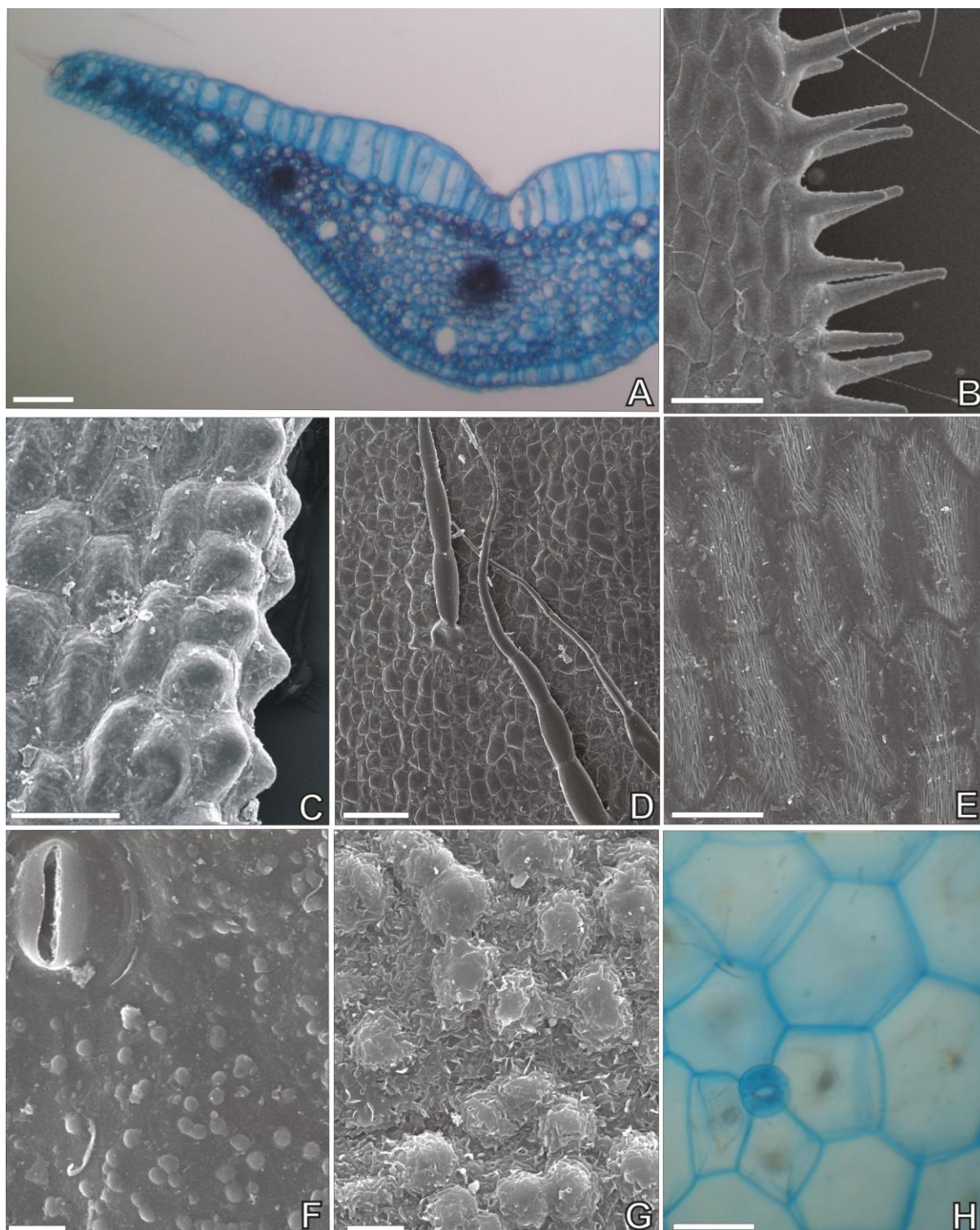


Fig. 3 Caracteres da folha. (A, H) análise em microscopia de luz. (B-G) análise em MEV. (A) *E. cotyledon*, secção transversal da base da folha; escala = 100 μm . (B) *Lankesterella ceracifolia*, bordo com tricomas simples; escala = 100 μm . (C) *Pseudoeurystyles*, bordo com papilas; escala = 100 μm . (D) *Lankesterella caespitosa*, tricomas unisseriados longos na região da nervura central; escala = 200 μm . (E) *L. caespitosa*, superfície evidenciando estrias epicuticulares; escala = 100 μm . (F) *Prescottia stachyodes*, superfície da face abaxial com cutícula verrucosa; escala = 10 μm . (G) *Sacoila lanceola*, superfície, face abaxial, verrucosa e com cera epicuticular em placas; escala = 10 μm . (H) *E. cotyledon*, epiderme da face abaxial com células poligonais; escala = 50 μm .

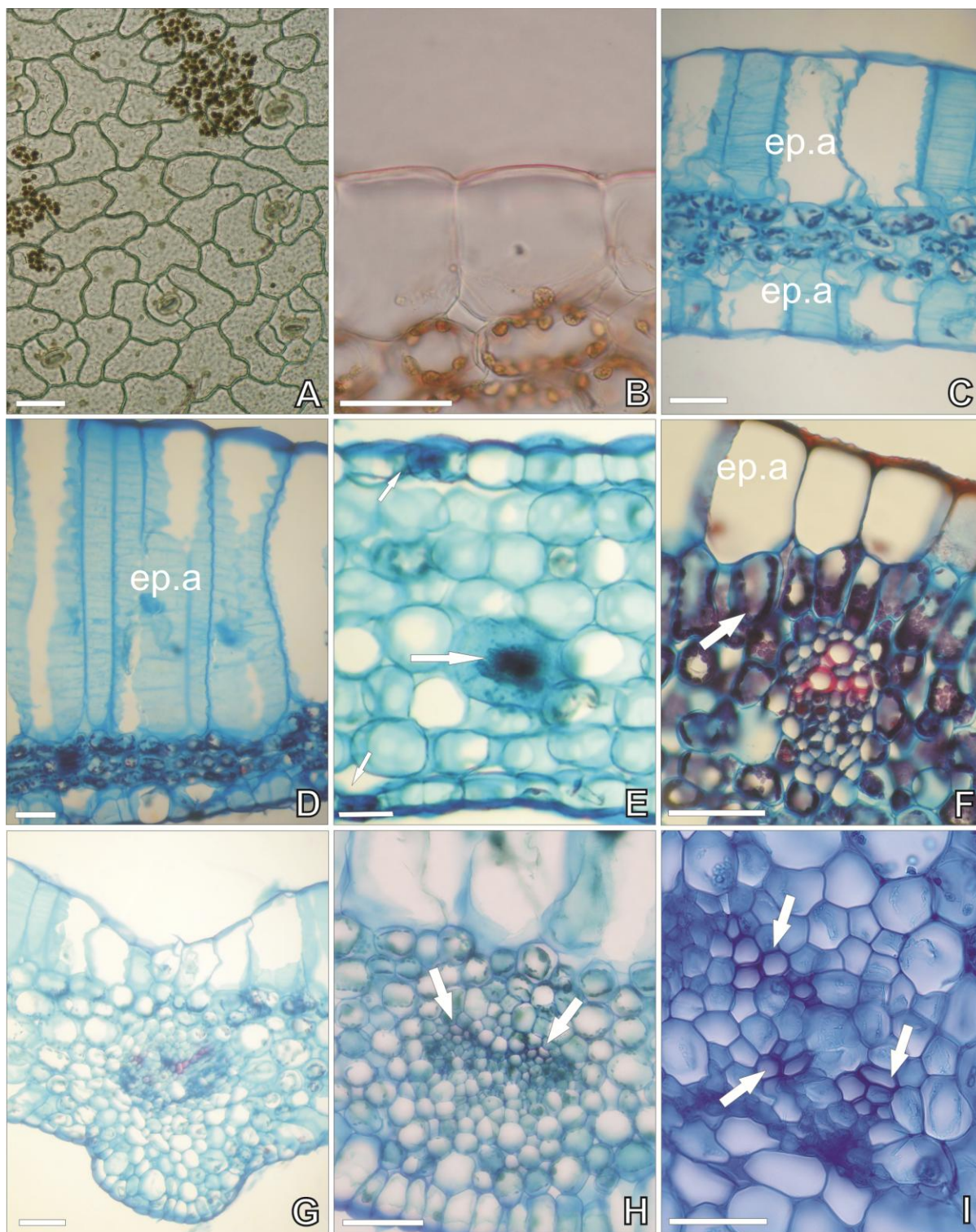


Fig. 4 Análise em microscopia de luz. (A) *Prescottia stachyodes*, epiderme com paredes sinuosas e estômatos com duas e três células anexas; escala = 50 μ m. (B) *Lankesterella caespitosa*, cutícula delgada; escala = 50 μ m. (C) *Eurystyles cotyledon*, epiderme aquífera nas duas faces (ep.a); escala = 50 μ m. (D) *L. ceracifolia*, epiderme aquífera; escala = 100 μ m. (E) *Cyclopogon apricus*, folha anfiestomática (setas) com mesófilo homogêneo e epiderme normal; escala = 100 μ m. (F) *Sacoila lanceolata*, epiderme aquífera (ep.a) e parênquima paliádico (seta); escala = 10 μ m. (G) *Pseudoeurystyles*, morfologia da nervura central; escala = 50 μ m. (H) *L. ceracifolia*, xilema binário; escala = 50 μ m. (I) *Pseudoeurystyles*, xilema trinário (setas); escala = 50 μ m.

5.1.3 Escapo Floral

O escapo floral é piloso nas espécies epífitas, com exceção de *Pseudoeurystyles* que apresenta escapo glabro. Em *Lankesterella* os escapos são providos de tricomas simples, unisseriados com ápice obtuso e tricomas capitados curtos e longos (Fig. 5A). As espécies de *Eurystyles* possuem escapo com tricomas simples e unisseriados com extremidade afilada (Fig. 5B). Das espécies terrestres, *P. stachyodes* tem escapo glabro, *S. lanceolata* apresenta tricomas vesiculosos e capitados com base dilatada ou não, enquanto que *C. apricus* e *M. cuspidata* são dotadas de tricomas capitados com pedicelo reto, diferindo na pilosidade mais densa em *C. apricus* (Fig. 5C, D). A cutícula é delgada em todas as espécies avaliadas (Fig. 5E) e as células epidérmicas, em secção transversal, são predominantemente arredondadas. O córtex é parenquimático, com cerca de três a seis camadas celulares limitadas ou não internamente por uma bainha esclerificada. Esta bainha não ocorre em *L. caespitosa* e nas espécies de *Eurystyles* (Fig. 5F), enquanto que *Pseudoeurystyles* e as demais espécies de *Lankesterella* e do grupo externo, apresentam de uma a quatro camadas de células esclerificadas (Fig. 5G). Em todas as espécies do grupo epífito o estelo é do tipo eustelo (Fig. 5F), enquanto que para as espécies do grupo externo foi observado o tipo atactostelo (Fig. 5G). Os feixes vasculares são do tipo colateral em todas as espécies, com xilema e floema unitários (Fig. 5H). No entanto, o floema pode ser binário como em *Pseudoeurystyles* e *Eurystyles cotyledon* (Fig. 5I). Idioblastos com ráfides estão presentes em todas as espécies.

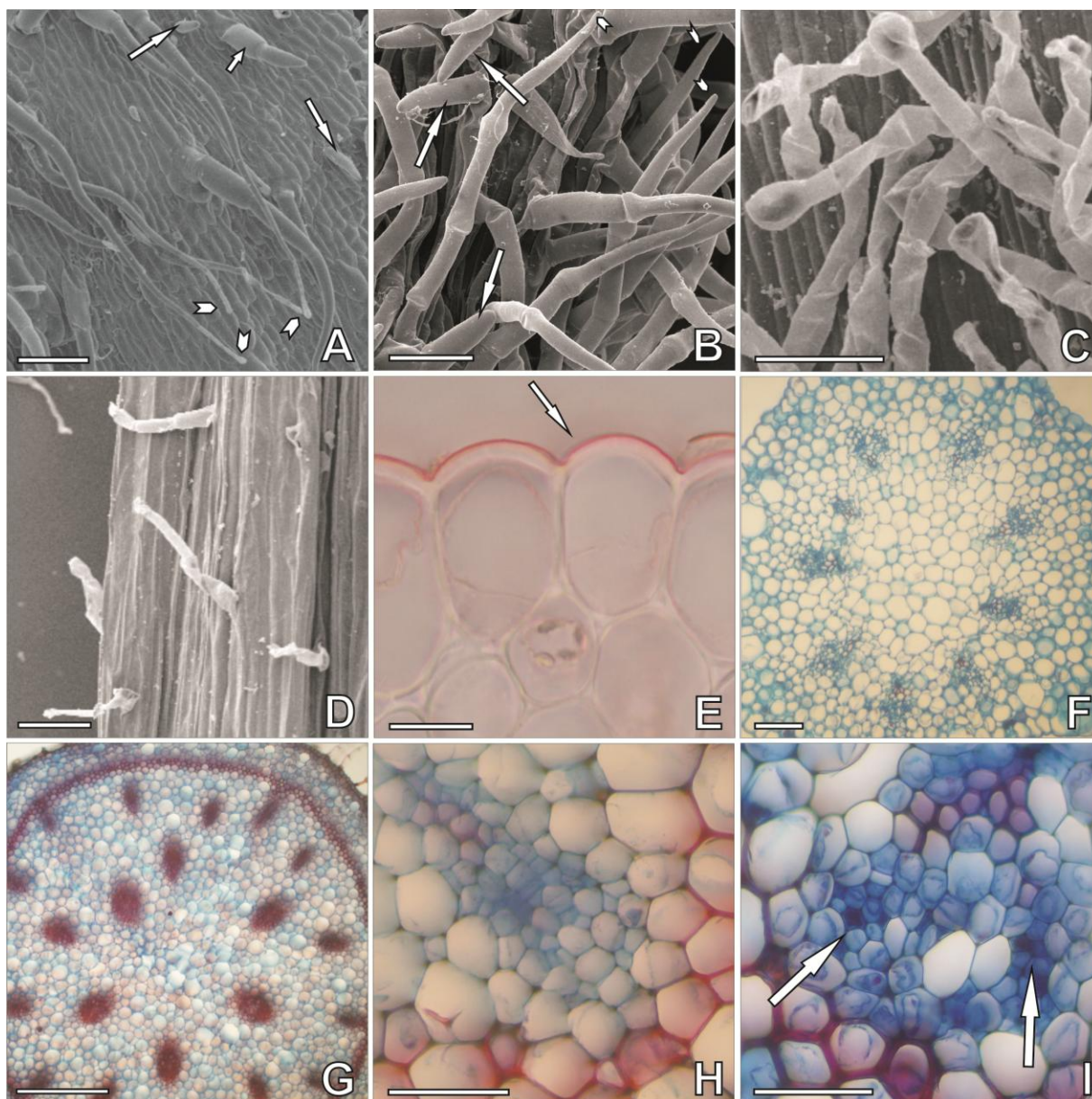


Fig. 5 Escapo floral. (A-D) superfície com tricomas em MEV. (E - I) secções transversais. (A) *Lankesterella caespitosa*, tricomas simples (seta) uniseriado (seta menor) e capitado longo (cabeça de seta); escala = 200 µm. (B) *Eurystyles cotyledon*, tricomas simples (seta) e uniseriados com o ápice afilado (cabeça de seta); escala = 100 µm. (C, D) *Cyclopogon apricus* e *Mesadenella cuspidata*, respectivamente, com tricomas capitados; escala = 100 µm. (E) *Pseudoeurystyles*, detalhe da cutícula delgada (seta); escala = 50 µm. (F) *E. cotyledon*, vista geral do eustelo; escala = 25 µm. (G) *Cyclopogon apricus*, atactostelo delimitado por bainha esclerificada; escala = 100 µm. (H) *Lankesterella ceracifolia*, feixe do tipo colateral e bainha esclerificada; escala = 50 µm. (I) *Pseudoeurystyles*, feixe colateral com floema binário (setas); escala = 50 µm.

5.1.4 Bráctea

O tamanho da bráctea em relação ao tamanho da flor é menor em todos os gêneros analisados, com exceção de *Eurystyles* que apresenta bráctea maior do que a flor. A maioria das espécies possui bráctea com bordo inteiro, com exceção de *Eurystyles* cujo bordo é serrilhado. *Eurystyles* possui poucos tricomas simples e unisseriados com ápice afilado, na região basal da bráctea, na face abaxial. No entanto, seu bordo serrilhado apresenta papilas, tricomas simples com ápice afilado e tricomas ramificados (Fig. 6A). *Lankesterella* possui tricomas simples e unisseriados com ápice obtuso e tricomas capitados, tanto na face abaxial quanto no bordo (Fig. 6B). *C. apricus*, *M. cuspidata* e *Pseudoeurystyles* (epífita) apresentam tricomas capitados e papilas no bordo (Fig. 6C) e na lâmina, exceto na lâmina de *Pseudoeurystyles*. *S. lanceolata* também apresenta tricomas capitados, com a célula basal dilatada ou não e tricomas vesiculosos. Estes tipos de tricomas ocorrem na face abaxial e no bordo (Fig. 6D). *Prescottia stachyodes* é totalmente glabra.

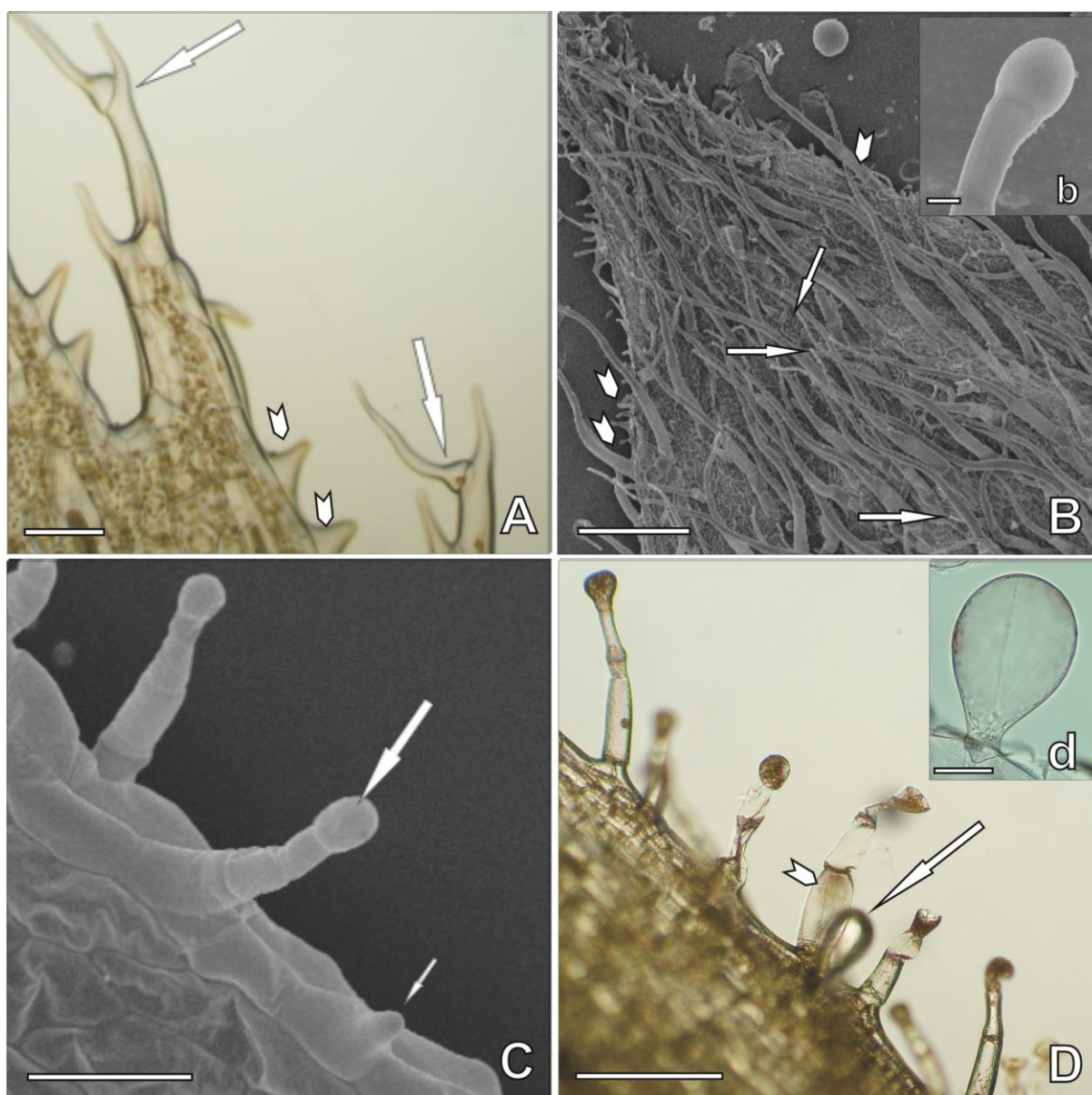


Fig. 6 Caracteres da bráctea. (A-D) análise em microscopia de luz. (B-C) análise em MEV. (A) *Eurystyles actnosophila*, bordo serrilhado com tricomas simples e ramificado (setas) e papilas (cabeça de seta); escala = 100 µm. (B) *Lankesterella caespitosa*, bordo liso com tricomas simples, (cabeça de seta) unisseriado e capitado (b) (setas); escala = 500 µm e 10 µm (b). (C) *Pseudoeurystyles*, tricoma capitado (seta maior) e papila (seta menor) escala = 100µm. (D) *Sacoila lanceolata*, bordo inteiro com tricomas vesiculoso (seta maior e detalhe) e capitado com a base dilatada ou não (cabeça de seta); escala = 500 µm e 50 µm em (d).

5.1.5 Sépalas e pétalas

Em *Lankesterella* as sépalas e pétalas, face abaxial, são pilosas e apresentam os mesmos tricomas presentes no escapo e bráctea (simples, unisseriado com ápice obtuso e capitado) (Fig. 7A). Porém, nas pétalas os tricomas estão concentrados apenas no ápice, estes ocorrem em maior concentração em *L. caespitosa* (Fig. 7B). Nas pétalas e sépalas, face adaxial, de *Eurystiles cotyledon* foram registrados tricomas simples com ápice obtuso e papilas (Fig. 7C) e na face abaxial, tricomas simples com base e ápice dilatados (fig. 7D). Na face abaxial da sépala de *Eurystiles (Pseudoeurystiles) lorenzii* foram registradas papilas e tricomas capitados com base dilatada e gargalo (Fig. 7E). Em *E. actnosophila* não foram registrados tricomas na face adaxial das pétalas e sépalas. As espécies do grupo externo apresentam sépalas com a face adaxial glabra e as pétalas glabras nas duas faces. No entanto, as sépalas, face abaxial, podem apresentar papilas, tricomas vesiculosos e capitados com base dilatada como em *Sacoila lanceolata* (Fig. 7F), papilas e tricomas capitados com pedicelo reto em *C. apricus* (Fig. 7G, H) e tricomas capitados com célula basal mais dilatada em *Mesadenella cuspidata* (Fig. 7I). *Prescottia stachyodes* possui sépalas e pétalas glabras (Fig. 7J).

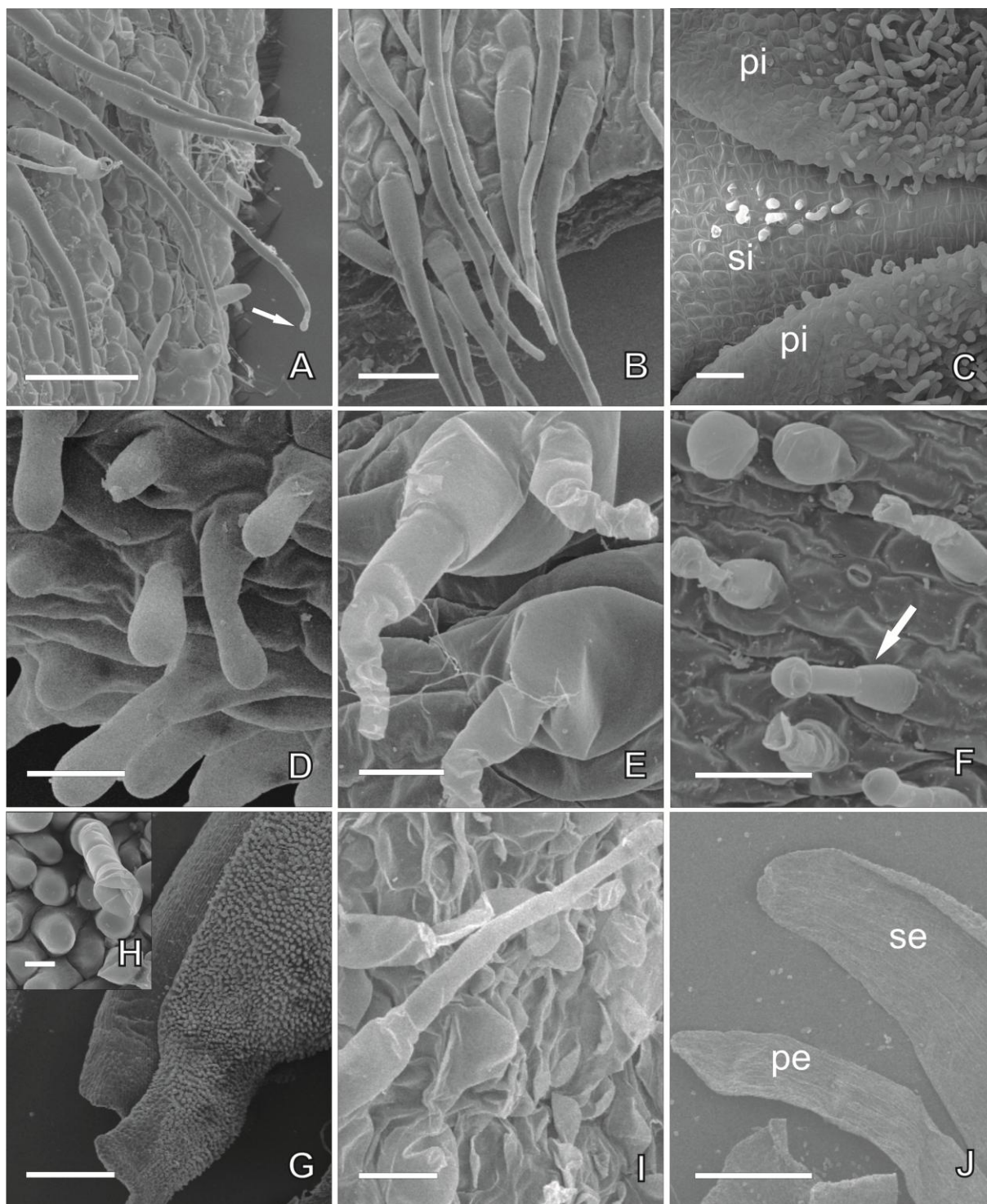


Fig. 7 Análise da superfície das pétalas e sépalas em MEV. (A) *Lankesterella caespitosa*, tricomas simples, unisseriado com ápice obtuso e capitado (seta); escala = 200 μm . (B) *L. caespitosa*, concentração de tricomas no ápice da pétala; escala = 100 μm . (C) *Eurystyles cotyledon*, pétalas (pi) e sépala (si), face interna, com tricomas simples e papilas; escala = 100 μm . (D) *E. cotyledon*, sépala face externa com tricomas simples com base dilatada e ápice arredondado; escala = 50 μm . (E) *Pseudoeurystyles*, tricomas capitados com a base dilatada; escala = 50 μm . (F) *Sacoila lanceolata*, tricomas vesiculosos e capitados com a base dilatada; escala = 100 μm . (G, H) *Cyclopogon apricus*, tricomas vesiculosos e capitados com pedicelo reto (H), escala = 500 μm e 20 μm . (I) *Mesadenella cuspidata*, tricoma capitado com célula basal dilatada; escala = 50 μm . (J) *Prescottia stachyodes*, sépala (se) e pétala (pe), face externa grabla; escala = 500 μm .

5.1.6 Labelo

As espécies de *Lankesterella* apresentam, na face adaxial, papilas e três tipos de tricomas: simples com parede estriada (Fig. 8A), simples com base dilatada afilando-se abruptamente num gargalo (Fig. 8B) (forma de garrafa) e vesiculoso (Fig. 8C, D), mais concentrados na face abaxial. Os tricomas em forma de garrafa estão mais concentrado na região central do labelo, enquanto que os tricomas simples, com parede estriada, se concentram na base. Na região apical e face externa do labelo ocorrem papilas e tricomas vesiculosos em todas as espécies analisadas (Fig. 8C, D). As espécies de *Eurystyles* apresentam, na face adaxial, tricomas simples com base dilatada e ápice arredondado (Fig. 8E). Estes são raros na face abaxial, com maior concentração no bordo e abundantes em toda face adaxial. *Pseudoeurystyles* apresenta superfície da face adaxial glabra, porém recoberta por estriações (Fig. 8F) e face abaxial com um único tipo de tricoma vesiculoso distribuído por toda face (Fig. 8G). Em *Cyclopogon apricus* foram registrados tricomas vesiculosos recobrindo todo ápice recurvado e tricomas simples formando um “corredor” no centro da face interna do labelo (Fig. 8H). Em *Sacoila lanceolata* ocorrem papilas e tricomas simples com ápice afilado na porção basal do labelo, formando touceira tanto na face adaxial como abaxial (Fig. 8I). *Mesadenella cuspidata* apresenta papilas e tricomas vesiculosos nas duas faces, com maior concentração na face adaxial. Nesta face, ocorre também, tricomas simples com ápice arredondado, na região mediana basal e tricomas simples com base dilatada e gargalo na porção central apical (Fig. 8J). *Prescottia Stachyodes* possui labelo destituído de tricomas e recoberto por estrias epicuticulares, nas duas faces, sendo mais proeminentes na região do bordo interno apical (Fig. 8K, L).

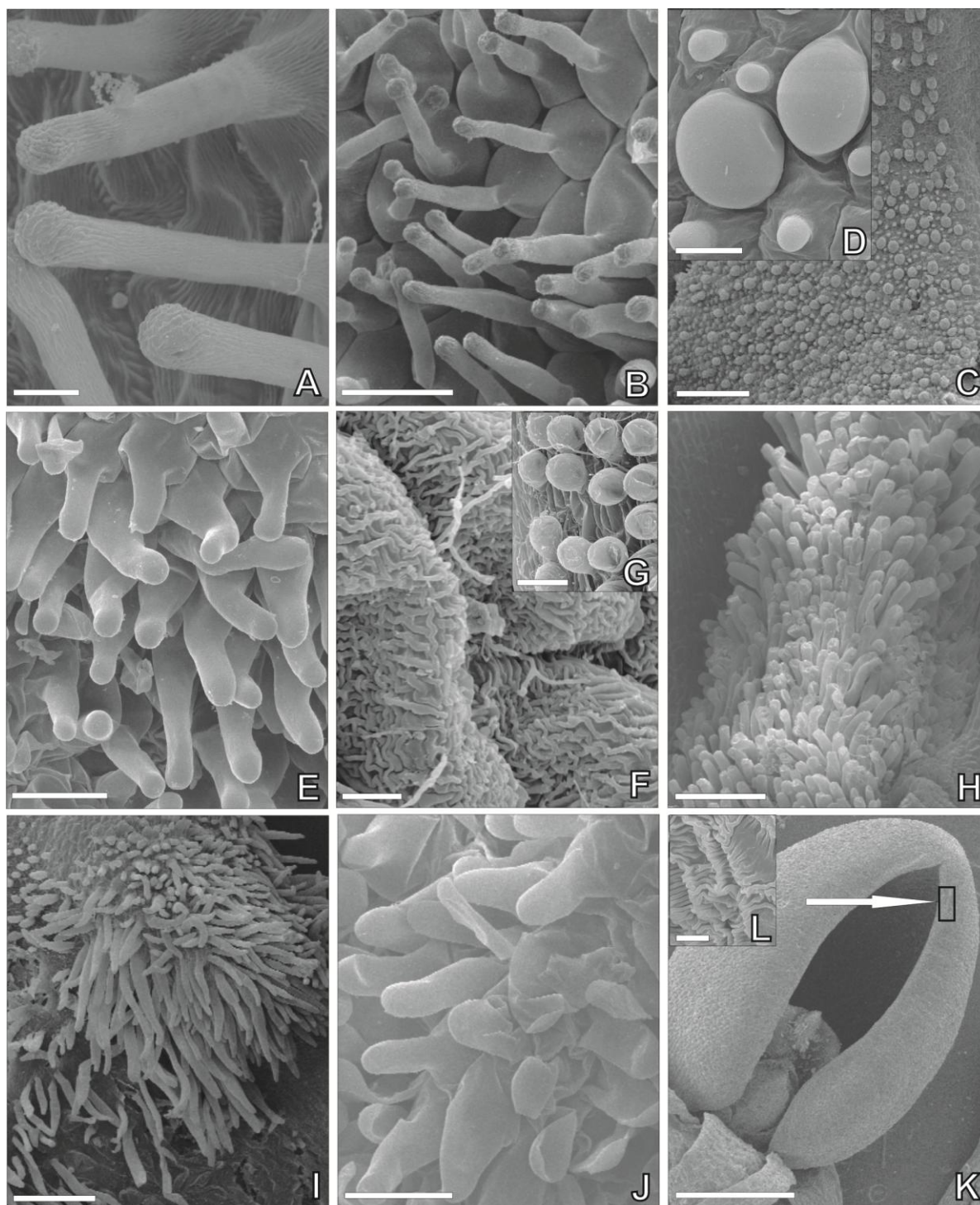


Fig. 8 Análise da superfície do labelo em (MEV). (A, B) *Lankesterella caespitosa*, tricomas simples com parede estriada (A), simples com base dilatada (B); escala = 20 μm e 100 μm . (C, D) *Lankesterella* sp (voucher 1039), tricomas vesiculosos e papilas, face externa; escala = 500 μm e 50 μm . (E) *Eurystyles cotyledon*, tricomas simples, lisos com a base dilatada e ápice arredondado; escala = 50 μm . (F, G) *Pseudoeurystyles*, estrias epicuticulares na face interna, e tricomas vesiculosos na face externa; escala = 10 μm e 100 μm . (H) *Cyclopogon apricus*, tricomas simples com parede lisa; escala = 200 μm . (I) *Sacoila lanceolata*, tricomas simples com ápice afilado, base do labelo; escala = 500 μm . (J) *Mesadenella cuspidata*, tricomas simples com base dilatada e ápice arredondado, na região central do labelo; escala = 50 μm . (K, L) *Prescottia stachyodes*, vista geral do labelo e pormenor das estrias epicuticulares; escala = 1 μm e 100 μm .

5. 2 ANÁLISE CLADÍSTICA

Foram identificados 61 caracteres qualitativos, destes, 39 binários e 22 multiestados, (tabela 2) utilizados na construção da matriz morfológica (apêndice 1). A busca heurística reteve uma árvore mais parcimoniosa com um comprimento de 96 passos, índice de consistência (CI) de 0.781 e de retenção (IR) 0.747. Dos 61 caracteres levantados, 41 são parcimoniosamente informativos, três constantes nesse nível de generalidade e 23 autopomórficos.

A análise indica que o clado epífito é monofilético, fortemente sustentado (valor de bootstrap (BP) = 83 e Índice de Decaimento (ID) = 5 e pode ser reconhecido pelas seguintes sinapomorfias: epiderme aquífera na face adaxial com altura das células maior do que o mesofilo (caracter 20); tipo do estelo do escapo floral (eustelo) (caracter 27); presença de tricomas simples no lado externo da sépala (caracter 37) e presença de estaminódios no rostelo (caracter 60). *Pseudoeurystyles* é grupo irmão do clado *Eurystyles/Lankesterella*. Este último clado (BP=64, ID=2), pode ser reconhecido pelas sinapomorfias: ausência de pecíolo (caracter 8); presença de tricomas no bordo da folha (caracter 9); presença de tricomas simples (caracter 22) e ausência de bainha esclerificada no escapo floral (caracter 27). O gênero *Eurystyles* apresenta um suporte robusto (BP=99, ID=6) sustentado por várias sinapomorfias como: bráctea com bordo serrilhado (caracter 34), presença de nectário conspicuo na base do labelo (caracter 59), rostelo acuminado menor do que os estaminódios (caracter 61). O gênero *Lankesterella* também aparece com alto suporte (BP= 100, ID= 10) e pode ser reconhecido por várias sinapomorfias como: velame uniestratificado sem espessamento e sem poros (caracter 2), ausência de tilossomo (caracter 3), presença de amido composto (caracter 5), esporão formado pelas sépalas laterais (caracter 43) (Fig. 9).

Tabela 2. Números atribuídos aos caracteres e seus estados, na raiz, folha, escapo floral e flor.

1.	Raiz tipo de tricoma: (0) <i>simples</i> (1) <i>espiralado</i> (2) <i>os dois tipos (simples e espiralado)</i>
2.	Raiz velame: (0) <i>unisseriado sem espessamento e sem poros</i> (1) <i>do tipo spiranthes com uma a três camadas</i>
3.	Raiz tilossomo tipo: (0) <i>ausente</i> (1) <i>lamelado</i>
4.	Raiz exoderme: (0) <i>sem espessamento</i> (1) <i>com espessamento escalariforme</i>
5.	Raiz amido: (0) <i>spirantossoma</i> (1) <i>amido composto</i>
6.	Raiz números de arcos de xilema/floema: (0) <i>até cinco</i> (1) <i>mais do que cinco</i>
7.	Peciolo: (0) <i>ausente</i> (1) <i>presente</i>
8.	Peciolo formato: (0) <i>cilíndrico</i> (1) <i>meia lua</i> (2) <i>em U</i> (3) <i>alado</i>
9.	Folha tricomas: (0) <i>ausente</i> (1) <i>presente</i>
10.	Folha papila: (0) <i>ausente</i> (1) <i>presente</i>
11.	Folha distribuição dos tricomas: (0) <i>no bordo</i> (1) <i>na nervura central</i> (2) <i>no bordo e nervura</i>
12.	Folha tipo de tricomas: (0) <i>simples</i> (1) <i>unisseriado com ápice obtuso</i>
13.	Folha tipo de cutícula (face adaxial): (0) <i>lisa</i> (1) <i>verrucosa</i> (2) <i>estriada</i> (3) <i>cera em plaquinhas</i>
14.	Folha tipo de cutícula (face abaxial): (0) <i>lisa</i> (1) <i>verrucosa</i> (2) <i>estriada</i> (3) <i>cera em plaquinhas</i>
15.	Folha distribuição dos estômatos: (0) <i>hipoestomática</i> (1) <i>anfiestomática</i>
16.	Folha formato das células da epiderme vista paradérmica (face abaxial): (0) <i>poligonal</i> (1) <i>irregulares</i> (2) <i>sinuosas</i>
17.	Folha epiderme (tipo) em secção transversal: (0) <i>não aquífera</i> (1) <i>aquífera</i>
18.	Folha altura das células da epiderme da face adaxial: (0) <i>menor ou = ao mesófilo</i> (1) <i>maior do que o mesófilo</i>
19.	Folha parênquima paliádico: (0) <i>ausente</i> (1) <i>presente</i>
20.	Folha xilema nervura mediana: (0) <i>unitário</i> (1) <i>binário</i> (2) <i>trinário</i>
21.	Escapo tricoma simples: (0) <i>ausente</i> (1) <i>com ápice afilado</i> (2) <i>com ápice obtuso</i>
22.	Escapo tricoma unisseriado: (0) <i>ausente</i> (1) <i>com a extremidade afilada</i> (2) <i>com a extremidade obtusa</i> (3) <i>com a célula basal dilata</i> (4) <i>com espessamento nas junções das células</i>
23.	Escapo tricoma capitado: (0) <i>ausente</i> (1) <i>curto/pedicelo reto</i> (2) <i>curto/pedicelo com base dilatada</i> (3) <i>longo/pedicelo reto</i> (4) <i>longo/pedicelo com base dilatada</i>
24.	Escapo tricoma vesiculoso: (0) <i>ausente</i> (1) <i>presente</i>
25.	Escapo estelo: (0) <i>eustelo</i> (1) <i>atactostelo</i>
26.	Escapo bainha esclerificada: (0) <i>ausente</i> (1) <i>presente</i>
27.	Bractea/lado abaxialtricoma simples: (0) <i>ausente</i> (1) <i>com ápice afilado</i> (2) <i>com ápice obtuso</i>
28.	Bractea/lado abaxialexterno tricoma unisseriado: (0) <i>ausente</i> (1) <i>com extremidade afilada</i> (2) <i>com extremidade obtusa</i>
29.	Bractea/lado externo tricoma capitado: (0) <i>ausente</i> (1) <i>curto/base reta</i> (2) <i>curto/base dilatada</i> (3) <i>longo base/dilatada</i>
30.	Bractea/lado externo papilas: (0) <i>ausente</i> (1) <i>presente</i>
31.	Bractea/lado externo tricoma vesiculoso: (0) <i>ausente</i> (1) <i>presente</i>
32.	Bractea bordo tipo: (0) <i>inteiro</i> (1) <i>serrilhado</i>
33.	Bractea bordo tricoma tipo: (0) <i>simples</i> (1) <i>unisseriado</i> (2) <i>ramificado</i> (3) <i>capitado</i> (4) <i>vesiculoso</i>
34.	Bractea tamanho da bractea floral em relação a flor: (0) <i>menor</i> (1) <i>maior</i>
35.	Sépala/lado externo tricoma simples: (0) <i>ausente</i> (1) <i>presente</i>
36.	Sépala/lado externo tricoma capitado: (0) <i>ausente</i> (1) <i>curto/base reta</i> (2) <i>curto/base dilatada</i> (3) <i>longo base/dilatada</i>
37.	Sépala/lado externo papilas: (0) <i>ausente</i> (1) <i>presente</i>
38.	Sépala/lado externo tricoma vesiculoso: (0) <i>ausente</i> (1) <i>presente</i>
39.	Sépala/lado interno papilas: (0) <i>ausente</i> (1) <i>presente</i>
40.	Sépala/lado interno tricoma simples: (0) <i>ausente</i> (1) <i>presente</i>
41.	Sépalas/espório formado pelas sépalas laterais: (0) <i>ausente</i> (1) <i>presente</i>
42.	Pétala/lado externo tricoma simples: (0) <i>ausente</i> (1) <i>presente</i>
43.	Pétala/lado externo tricoma unisseriado: (0) <i>ausente</i> (1) <i>presente</i>
44.	Pétala/lado interno papila: (0) <i>ausente</i> (1) <i>presente</i>
45.	Pétala/lado interno tricoma simples: (0) <i>ausente</i> (1) <i>presente</i>
46.	Pétalas livres/adnadas: (0) <i>pétalas livres</i> (1) <i>pétalas adnatas a sépala dorsal</i>
47.	Labelo/lado externo tricoma simples: (0) <i>ausente</i> (1) <i>presente</i>
48.	Labelo/lado externo tricoma simples: (0) <i>com ápice obtuso</i> (1) <i>com ápice afilado</i> (2) <i>com base dilatada e gargalo (garrafa)</i>
49.	Labelo/lado externo papilas: (0) <i>ausente</i> (1) <i>presente</i>

50. Labelo/lado externo tricoma vesiculoso: (0) ausente (1) presente
51. Labelo/lado externo células com estriações: (0) ausente (1) presente
52. Labelo/lado adaxial papilas: (0) ausente (1) presente
53. Labelo/lado interno tricoma vesiculoso: (0) ausente (1) presente
54. Labelo/lado interno tricoma simples: (0) ausente (1) presente
55. Labelo/lado interno tricoma simples: (0) com ápice obtuso (1) com ápice afilado (2) com parede lisa (3) com parede estriada (4) com base alargada e gargalo (garrafa)
56. Labelo/lado interno células com estriações: (0) ausente (1) presente
57. Labelo nectário na base do labelo: (0) ausente (1) presente inconspícuo (2) presente conspícuo
58. Rostelo estaminódios: (0) ausente (1) presente
59. Rostelo tipo: (0) acicular (1) acuminado maior do que os estaminódios (2) acuminado menor do que os estaminódios (3) laminar truncado (4) retuso

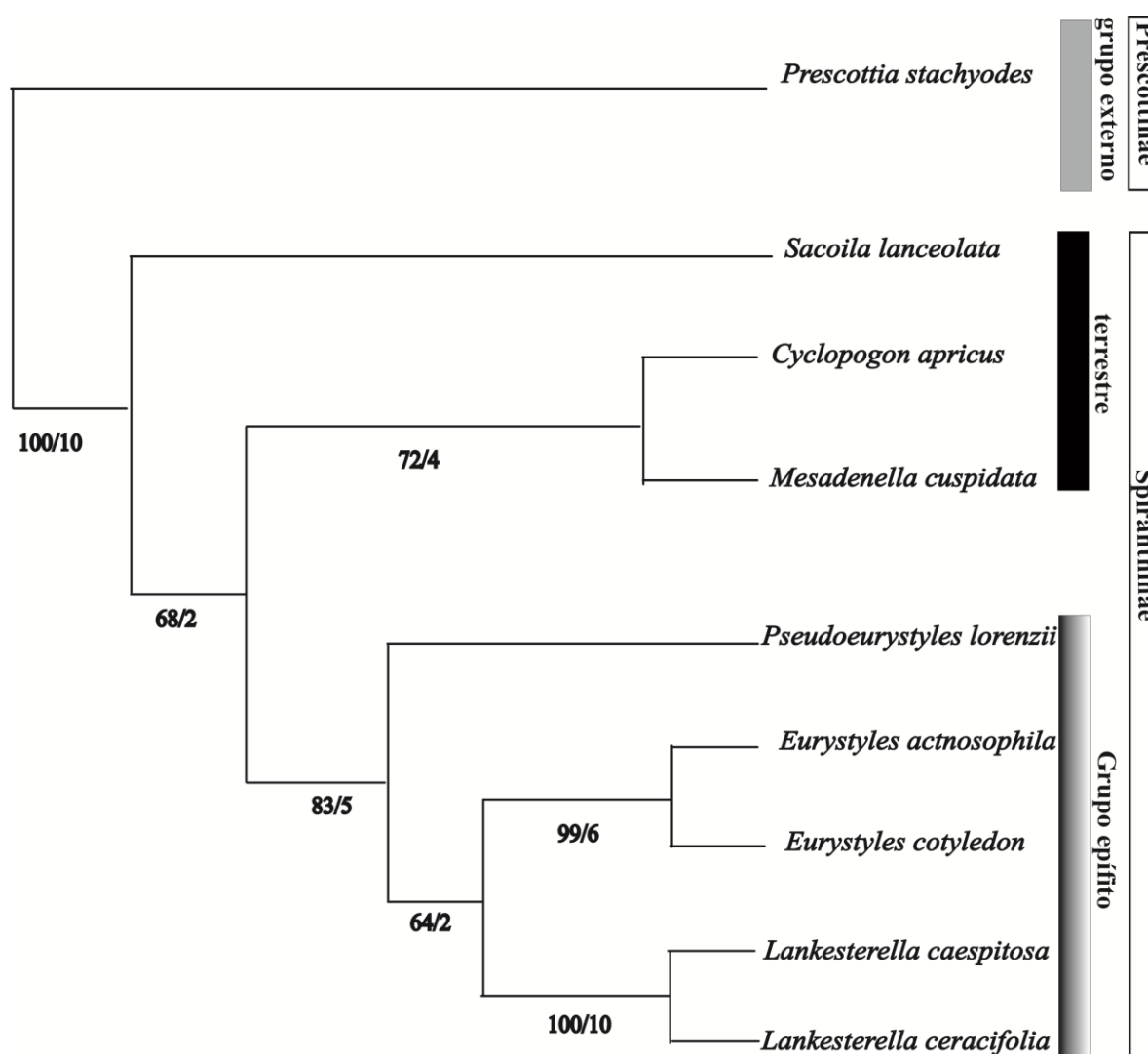


Figura 9- Árvore mais parcimoniosa encontrada pela busca heurística dos caracteres anatômicos (valores sob os ramos correspondem a Bootstrap ≥ 50 e Índice de Decaimento limitado a 10 passos).

6 DISCUSSÃO

As características anatômicas da raiz das espécies de *Lankesterella* e *Eurystyles* apresentam caracteres de valor diagnóstico taxonômico, registrados aqui pela primeira vez, como o tipo de velame, tilossomo, amiloplastos e pêlos radiculares. Estudos anteriores em espécies de Orchidaceae de hábito epífito têm retratado tricomas radiculares (Benzing *et al.*, 1982; Moreira & Isaias, 2008), porém não do tipo espiralado.

O velame nas espécies epífitas e terrestres da subtribo Spiranthinae é constituído de uma ou duas camadas de acordo com as características descritas para o grupo (Porembski & Barthlott, 1988; Pridgeon *et al.* 2003; Figueroa *et al.*, 2008). Apesar de ter sido indicado como uma sinapomorfia para essa subtribo, a análise cladística morfológica aponta alterações, dentro do clado epífito, ou seja, uma possível perda das características que determinam o velame do tipo spiranthes, em *Lankesterella*. O estado de caractere (velame do tipo spiranthes com duas camadas) aparece como uma apomorfia para *Eurystyles* (*Pseudieurystyles*) *lorenzii* (Fig. 10A).

A presença de tilossomo do tipo lamelado foi registrada para todas as espécies, menos para *Lankesterella*. A máxima parcimônia indica uma possível perda deste caractere neste gênero. Figueroa *et al.* (2008) indicaram tilossomo do tipo lamelado como uma sinapomorfia para Spiranthinae. No entanto, este caractere também foi observado em *Prescottia stachyodes* (subtribo Prescottinae).

No presente estudo foi registrada exoderme com ou sem espessamento escalariforme, variando quanto a presença ou ausência entre as espécies. Exoderme com espessamento escalariforme é presente nas espécies do gênero *Eurystyles* e ausente no subgênero *Eurystyles* (*Pseudoeurystyles*) *lorenzii* e *Lankesterella*, bem como na maioria das espécies terrestres. A análise cladística aponta este caractere como sendo lábil para inferir relações filogenéticas nas espécies analisadas. A exoderme com espessamento escalariforme foi sugerida como

característica de Cranichideae (Stern *et al.*, 1993b), tendo sido também registrada por Figueroa *et al.* (2008).

O córtex é amilífero em todas as espécies. No entanto, a presença de espirantossomo registrada nas espécies terrestres e nas espécies do gênero *Eurystyles* corroboram com os estudos de Stern *et al.* (1993a, 1993b) e Salazar *et al.* (2003). Embora, tenha sido considerada uma sinapomorfia para Cranichideae, a análise cladística indica uma possível reversão neste caractere para o estado de caractere (amido composto) nas espécies de *Lankesterella* (Fig. 10B).

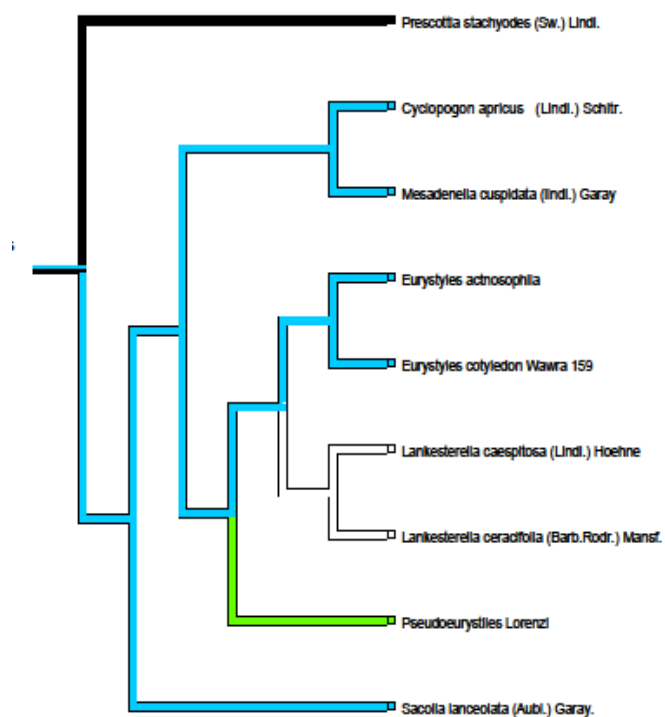
As folhas das espécies epífitas apresentam caracteres diagnósticos indicando sinapomorfias que corroboram com a monofilia do grupo, como a cutícula estriada na folha e epiderme aquífera com altura das células da face adaxial maior do que o mesofilo (Fig. 11A). Estes caracteres reforçam a sistemática do grupo sugerida por Dressler (1981) e Soto-Arenas (1993) que aproximam estes dois gêneros baseados na similaridade da morfologia vegetativa.

A sistemática do grupo em nível de tribo e subtribo pode ser reforçada com os caracteres diagnósticos foliares, como: células da epiderme (vista frontal) poligonais, cutícula delgada, mesofilo homogêneo e xilema unitário/binário. No entanto, foi constatado que esse caractere é variável no grupo epífita, apresentando xilema unitário, binário e trinário. Xilema binário foi sugerido como característica de Cranichideae por Stern *et al.* (1993b) e posteriormente para Diurideae e Cranichideae por Salazar *et al.* (2003).

A análise cladística dos seis caracteres do escapo floral aponta que todos são diagnósticos, sendo quatro destes com 100% de consistência, como o estelo do tipo do eustelo, que é uma sinapomorfia para o grupo epífita (Fig. 11B). Este resultado evidencia que o escapo pode ser mais uma opção na busca de sinapomorfias para grupos complexos, assim como já reportado para outras monocotiledôneas como, por exemplo, Eriocaulaceae (Scatena *et al.*, 1999).

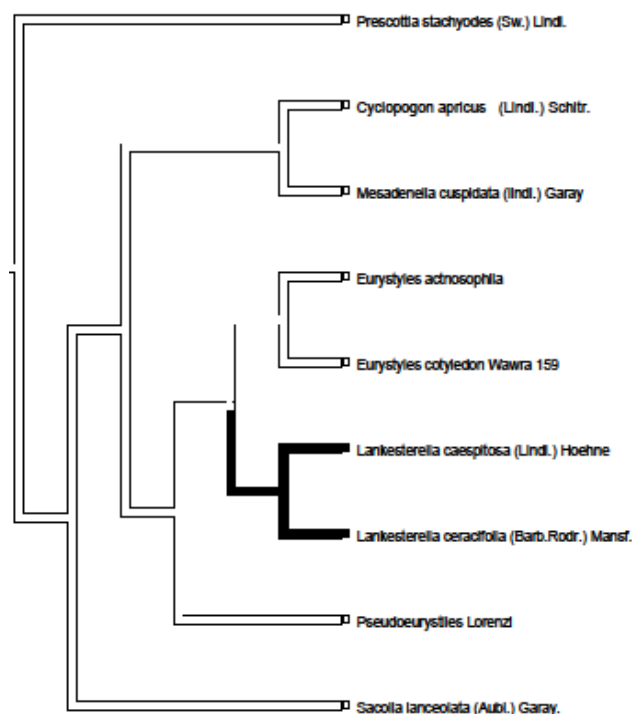
As diferenças florais nas espécies do grupo epífito são evidentes, pois de 33 caracteres anatômicos das flores, somente três apontam sinapomorfias para o clado epífito, tricomas simples no lado externo das sépalas (caractere 37), a presença de estaminódios no rostelo (caractere 60) e rostelo do tipo acuminado (caractere 61). *Eurystyles* (*Pseudoeurystyles*) *lorenzii* é a espécie que mais difere quanto à superfície do labelo, podendo ser reconhecido por várias apomorfias, como: ausência de tricoma simples e unisseriado na bráctea (caracteres 29 e 30), bráctea com tricomas capitados no bordo (caractere 35), ausência de papilas e tricomas simples no lado interno do labelo (caracteres 54 e 56) e estriações cuticulares no lado interno do labelo. *Lankesterella* difere de *Eurystyles* pela presença de caracteres diagnósticos, como tricomas capitados com base dilatada (caractere 31), esporão formado pelas sépalas laterais (caractere 43), tricomas simples unisseriados no lado externo das pétalas (caractere 44 e 45) e presença de tricoma vesiculoso no lado interno do labelo (caractere 55). Estes resultados podem inferir significância na hipótese de Salazar & Dressler (2011), que características florais são mais variáveis, enquanto que os caracteres vegetativos são conservativos. Isto também é observado em outros grupos de orquídeas, como em Pleurothallidinae (Pridgeon *et al.*, 2001) e em Malaxideae (Cameron, 2005). Segundo Salazar & Dressler (2011) nestes grupos e na subtribo Spiranthinae, a especiação parece estar relacionada à evolução de diferentes estruturas florais em função de diferentes agentes polinizadores. Contudo, os caracteres anatômicos são suficientes para sustentar fortemente o monofiletismo do grupo epífito e segregar *Eurystyles* (*Pseudoeurystyles*) *lorenzii* do gênero *Eurystyles* posicionando-o sistematicamente como um grupo irmão de *Eurystyles/Lankesterella*.

- uniextratificado sem espessamento e sem poros
- do tipo spiranthes com uma camada
- do tipo spiranthes com duas camadas
- do tipo soiranthes com três camadas



A

- spirantossoma
- amido composto

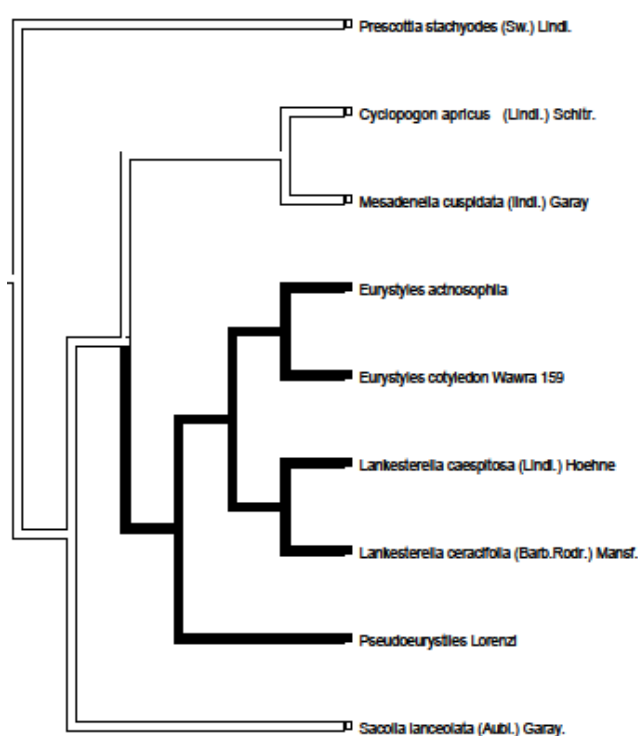


B

Fig. 10- Otimização dos estados de caracteres na árvore mais parcimoniosa. (A) tipo de velame (caracter 2) (IC = 1); (B) tipo de amido (caracter 5) (IC = 1).

□ menor ou = ao mesofilo
 ■ maior do que o mesofilo

A



□ eustelo
 ■ atactostelo

B

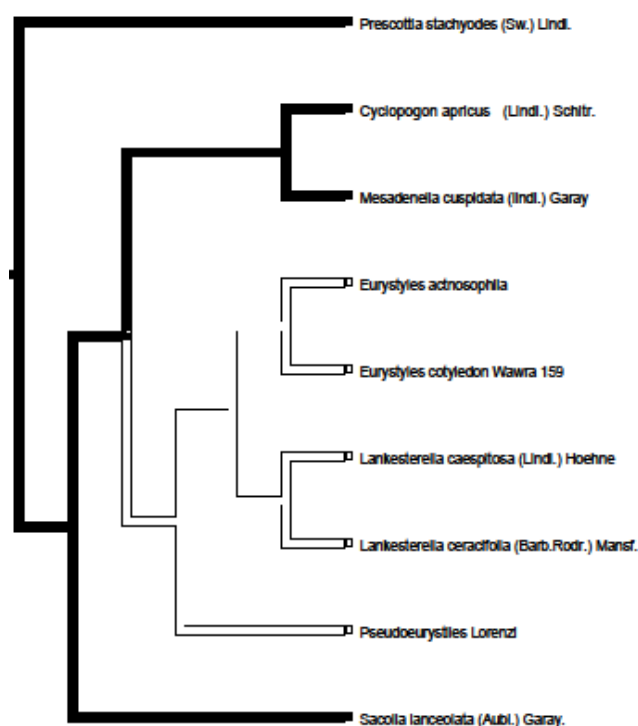


Fig. 11- Otimização dos estados de caracteres na árvore mais parcimoniosa. (A) Altura das células da epiderme na face adaxial (caracter 19) (IC= 1); (B) Tipo de estelo do escapo floral (caracter 26) (IC = 1).

REFERÊNCIAS

- Balogh P. 1982.** Generic redefinition in subtribe Spiranthinae (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **69**: 1119–32.
- Benzing DH, Ott DW & Friedman, WE. 1982.** Roots of *Sobralia macrantha* (Orchidaceae): structure and function of the velamen-exodermis complex. *American Journal of Botany* **69**: 608–614.
- Bukatsch F. 1972.** *Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau safranin*. Mikrokosmos. vol. 6.
- Burns-Balogh P, Robinson H, Foster MS. 1985.** The capitates-flowered epiphytic Spiranthinae (Orchidaceae) and a new genus from Paraguay. *Brittonia* **37**: 154–162.
- Berlyn GP, Miksche JP. 1976.** *Botanical microtechnique and cytochemistry*. Ames, The Iowa State Press. 326.
- Cameron KM. 2005.** Leave it to the leaves: a molecular phylogenetic study of Malaxideae (Epidendroideae, Orchidaceae). *American Journal of Botany* **92**: 1025–1032.
- Dressler RL. 1981.** *The orchids: natural history and classification*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA.
- Evert RF. 2006.** *Esau's Plant anatomy*. 3ª edição. Published by John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Fahn A. 1990.** *Plant Anatomy*. 4ª edição. British Library Cataloguing in Publication Data.
- Felsenstein J. 1985.** Confidence limits on phylogenies: an approach to using bootstrap. *Evolution* **39**: 783–791.
- Figueroa C, Salazar GA, Zavaleta HA, Engleman EM. 2008.** Root character evolution and systematics in Cranichidinae, Prescottiinae and Spiranthinae (Orchidaceae, Cranichideae) *Annals of Botany* **10**: 509–520.
- Fitch, WM. 1971.** Towards defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology* **20**: 406–416.
- Goloboff P, Farris S, Nixon K. 2000.** TNT (Tree analysis using New Technology) (BETA) version 1.1. Published by the authors, Tucumán, Argentina.
- Górniak MJ, Mytnik-Ejsmont P, Rutkowski P, Tukatto P, Minasiewicz J, Szlachetko DL. 2006.** Phylogenetic relationships within the subtribe Spiranthinae s.l.(Orchidaceae) inferred from the nuclear ITS region. *Biodiv. Res. Cons.* 1–2: 18–24.
- Moreira ASEP, Isaias RMS. 2008.** Comparative Anatomy of the Absorption Roots of Terrestrial and Epiphytic Orchids. *Braz. arch. biol. technol.* **51**: 83–93.
- Page RDM. 2001.** Nexus Data Editor. <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/NDE.html>. Accessed 11Abril 2013.
- Pridgeon AM, Solano MW, CHASE MW. 2001.** Phylogenetic relationships in Pleurothallidinae (orchidaceae): combined evidence from nuclear and plastid DNA sequences. *American Journal of Botany* **88**: 2286–2308.
- Pridgeon AM, Cribb FF, Chase MW, Rasmussem FN. 2003.** *Genera Orchidacearum* (volume3) Orchidoideae (part two) Vanillaideae Royal Botanic Gardens, Kew. Oxford.
- Porembski S & Barthlott. 1988.** Velamen radicum micromorphology and classification of the Orchidaceae. *Nordic Journal of Botany* **8**: 117–137.
- Salazar GA, Chase MW, Soto Arenas MA, Ingrouille M. 2003.** Phylogenetics of Cranichideae with emphasis on Spiranthinae (Orchidaceae, Orchidoideae): Evidence from plastid and nuclear DNA sequences. *American Journal of Botany* **90**: 777–795.
- Salazar GA, Dressler RL. 2011.** The leaves got it right again: DNA phylogenetics supports a sister-group relationship between *Eurystiles* and *Lankesterella* (Orchidaceae: Spiranthinae). *Lankesteriana* **11**: 337–347.

- Sass JE. 1951.** *Botanical microtechnique*. 2a ed. The Iowa State College Press.
- Scatena VL, Cardoso VA, Giulietti AM. 1999.** Morfo-anatomia de espécies de *Blastocaulon* Ruhland (Eriocaulaceae). *Acta Botanica Brasilica* **I**: 29–4.
- Soto Arenas MA. 1993.** *Eurystiles*, a new generic record for the Mexican orchid flora. *Orquídea* (Mexico) **13**: 269–74.
- Stern WL, Aldrich HC, McDowell LM, Morris MW, Pridgeon AM. 1993.** Amyloplasts from cortical root cells of Spiranthoideae (Orchidaceae). *Protoplasma* **172**: 49–55.
- Stern WL, Morris MW, Judd WS, Pridgeon AM, Dressler RL. 1993.** Comparative vegetative anatomy and systematic of Spiranthoideae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **113**: 161–197.
- Swofford DL. 2003.** PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). (Version 4). Sinauer Associates, Sunderland.
- Szlachetko DL. 1995.** Fragmenta Floristica et Geobotanica, Supplement. *Systema Orchidaleum* **3**: 1–152.

7 CAPÍTULO II

EVOLUÇÃO DE CARACTERES ANATÔMICOS EM *SPIRANTHINAE* LINDL. COM ÊNFASE NOS CLADOS *PELEXIA* E *STENORRHYNCHOS* (ORCHIDACEAE)

Contextualização e objetivo Segundo estudo filogenético, baseado em dados moleculares, a subtribo *Spiranthinae* é fortemente sustentada como um grupo monofilético e foi subdividida em quatro clados. Portanto, há várias divergências nos caracteres das espécies que agrupam cada clado, como por exemplo, os observados em algumas espécies do gênero *Pelexia*, em que o rostelo é curto e o viscidium apical. Essas características são similares em várias espécies do gênero *Sauroglossum* (clado *Stenorrhynchos*). O objetivo deste estudo é levantar caracteres anatômicos vegetativos diagnósticos para subsidiar a filogenia do grupo.

Métodos Foram analisados os caracteres anatômicos da raiz, folha e escapo floral de 34 espécies da tribo *Cranichideae*. Destas, 21 constituem o clado *Pelexia*, sete o clado *Stenorrhynchos* e seis o grupo externo. A análise anatômica foi realizada com técnicas comuns para microscopia de luz e eletrônica de varredura. Vinte e sete espécies foram utilizadas na análise filogenética reunindo 32 caracteres morfológicos e 764 moleculares (nrITS).

Principais resultados Todas as espécies apresentam vários caracteres anatômicos em comum, como endoderme delgada, idioblastos com ráfides e xilema binário. Caracteres diagnósticos como, tilossomo lamelado, espirantossomo, já estabelecidos em estudos anteriores, foram confirmados; bem como a identificação de novos caracteres, como cutícula verrucosa, células epidérmicas aquíferas e caracteres do escapo floral.

Conclusões A análise filogenética, utilizando somente dados morfológicos, é insuficiente para propor uma hipótese filogenética para o grupo. A análise tanto de ITS quanto a combinada (morfológica + ITS) foi de importância significativa para a sistemática do grupo, permitindo o reconhecimento de caracteres diagnósticos em níveis de clados, subtribo e tribo.

Palavras-chave: anatomia, filogenia, folha, raiz, ITS.

8 INTRODUÇÃO

A subtribo *Spiranthinae* Lindl. (Tribo *Cranichideae* (Lindl.) Endl., *Orchidaceae*) compreende aproximadamente 40 gêneros e se restringe a região neotropical, com exceção do gênero *Spiranthes* Rich. e da espécie *Cyclopogon obliquus* (J.J. Sm.) Szlach. que também são encontrados em partes do sudeste da Ásia (Pridgeon *et al.*, 2003). Segundo o estudo filogenético de Salazar *et al.* (2003), baseado em dados moleculares, a subtribo *Spiranthinae* é fortemente sustentada como um grupo monofilético. Estes autores subdividiram *Spiranthinae* em quatro clados (*Stenorrhynchos*, *Pelexia*, *Spiranthes* e *Eurystyles*).

No clado *Pelexia* Salazar *et al.* (2003) agruparam os gêneros anteriormente atribuídos a “Aliança *Pelexia*” (Burns-Balogh & Robinson, 1983) e a subtribo *Cyclopogoninae* (Szlachetko, 1995) incluindo *Cyclopogon s.l.*, *Pelexia*, *Sarcoglottis*, *Veyretia* mais *Odontorrhynchos* e *Coccineorchis* (Pridgeon *et al.*, 2003). Esses autores constataram várias divergências nos caracteres das espécies que as agrupam, como os observados em algumas espécies do gênero *Pelexia*, em que o rostelo é curto e o viscidium apical. Essas características são similares em várias espécies do gênero *Sauroglossum* (clado *Stenorrhynchos*). Além disso, a antera em muitas espécies de *Brachystele*, *Odontorrhynchus* e *Sauroglossum* tem uma extensão apical distinta similar ao encontrado nas espécies da “Aliança *Pelexia*” (cf. Szlachetko & Rutkowski, 2000).

O clado *Stenorrhynchos* s. s. foi agrupado a outros gêneros considerados próximos como: *Eltroplectris*, *Mesadenella*, *Pteroglossa* e *Sacoila* (Pridgeon *et al.*, 2003; Salazar *et al.* 2003). Este clado (*Stenorrhynchos*) que inicialmente agrupou as espécies com rostelo rígido e subulado (Balogh, 1982; Burns-Balogh, 1986), segundo Salazar *et al.* (2003) apresenta divergência, como as detectadas em *Coccineorchis*, que foi tratado como uma seção de *Stenorrhynchos* por Balogh (1982). No entanto, Salazar *et al.* (2003) não evidenciaram

proximidade entre a linhagem de *Stenorrhynchos* e sim como um grupo irmão do clado *Pelexia*. Além disso, *Dichromanthus aurantiacus* (Lex.) Salazar & Soto Arenas, que tem sido tradicionalmente considerado um membro de *Stenorrhynchos*, próximo a espécie tipo do gênero (*S. speciosum*), também foi desconsiderada por Salazar *et al.* (2003) que evidenciou uma proximidade junto ao clado *Spiranthes*.

Diante das divergências sistemáticas e na tentativa de alavancar hipóteses filogenéticas, este trabalho tem por objetivo identificar caracteres anatômicos de valor diagnóstico e combiná-los a análise filogenética com (ITS) em espécies da subtribo *Spiranthinae*, subfamília *Orchidoideae* (*Orchidaceae*) com ênfase nos clados *Pelexia* e *Stenorrhynchos* (Salazar *et al.* 2003) para complementar os estudos filogenéticos do grupo.

9 MATERIAL E MÉTODOS

9.1 Espécies estudadas

Foram analisadas 34 espécies/ 19 gêneros pertencente à tribo *Cranichideae*. Destas, 21 espécies pertencem ao clado *Pelexia* e sete ao clado *Stenorrhynchos*. Conforme classificação de Pridgeon *et al.* (2003) foram determinadas seis espécies/seis gêneros para o grupo externo (Tabela. 1).

9.2 Microscopia de luz

As plantas foram coletadas diretamente no ambiente de ocorrência, fixadas em álcool etílico 70% ou FAA 50 (Johansen, 1940) e armazenadas em álcool etílico 70%. As amostras, principalmente de raiz e escapo, foram seccionadas a mão livre e as lâminas montadas de forma semipermanente. A maioria das amostras foi submetida à infiltração em polietilenoglicol (PEG 1500 U.S.P.) por no máximo 12 horas em estufa a 60°C. em troca parcial (1:1-PEG + álcool etílico 70%) e quatro horas em PEG puro. Os blocos foram

seccionados com 50 µm de espessura e as lâminas montadas de forma semipermanente. Os cortes foram submetidos a colorações e testes histoquímicos como: safrablau (Bukatsch, 1972, modificado por Kraus e Arduim, 1997), Sudan III ou IV (Sass, 1951) e teste para detecção de amido, segundo (Berlyn & Miksche, 1976). As lâminas semipermanentes foram montadas com Gelatina glicerizada 50%. As observações e fotomicrografias foram feitas em microscópios modelos Zeiss com câmera fotográfica acoplada. A classificação dos grãos de amido e a classificação da espessura da cutícula (<3µm = delgada/ 3-10 µm = moderada/ >10 µm = espessa) seguiu Stern *et al.* (1993a, 1993b) respectivamente. A classificação da caracterização do espaço supraendodermal seguiu a de Figueroa *et al.* (2008).

9.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Amostras da raiz e folha foram desidratadas em série etílica e secas via ponto crítico com CO₂; afixadas em suportes metálicos com fita de cobre adesiva; metalizadas com ouro e analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM - 6360LV Scanning Electron Microscope (JEOL Ltd, Tokyo, Japan) no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

Tabela 1. Lista dos taxa estudados com as informação dos vouchers, localidades, e respectivas partes analisadas (R= raiz, F= folha, E= escapo) (* espécies utilizadas na análise molecular).

Taxon	voucher	partes estudadas	localidade
grupo externo			
<i>Aspidogyne longicornu</i> (Cogn.) Garay*	Smidt, E. C. 930	F	Brasil, Paraná, Pontal do Paraná
<i>Baskervilla paranaensis</i> (Kraenzl.) Schltr.*	Blum, C. T. sn	F,	Brasil, Paraná, Moretes
<i>Cranichis candida</i> (Barb. Rodr.) Cogn.	Meyer, A. sn	R, F, E	Brasil, Paraná, Guaraqueçaba
<i>Microchilus arietinus</i> (Rchb.f.&Warm.) Ormerod*	Smidt, E. C. 955	F, E	Brasil, Paraná, Antonina
<i>Platythelys paranaensis</i> (Kraenzl.) Garay	Mancinelli, W. S. Sn	F, E	Brasil, Santa Catarina
<i>Prescottia stachyodes</i> (Sw.) Lindl. (2 indivíduos)*	Lemos, J. V. sn	R, F	Brasil, Paraná, Antonina
Clado <i>Stenorhynchos</i>			
<i>Eltroplectris calcarata</i> (Sw.) Garay & Sweet*	Smidt, E. C. 200	F, E	Brasil, Bahia, Palmeiras
<i>Eltroplectris triloba</i> (Lindl.) Pabst *	Smidt, E. C. 201	F, E	Brasil, Bahia, Palmeiras
<i>Mesadenella cuspidata</i> (lindl.) Garay*	Smidt, E. C. 975	R, F, E	Brasil, Paraná, Bocaiúva do Sul
<i>Sacoila lanceolata</i> (Aubl.) Garay.*	Ceschin, F. 01	R, F, E	Brasil, Paraná, Curitiba
<i>Sauroglossum nitidum</i> (Vell.) Schltr.	Smidt, E. C. 1007	R, F	Brasil, Paraná, Bocaiúva do Sul
<i>Skeptrostachys congestiflora</i> (Cogniaux) Garay*	Smidt, E. C. 209	R, F, E	Brasil, Bahia, Palmeiras
<i>Thelyschista ghyllanyi</i> (Pabst) Garay *	Smidt, E. C. 223	F	Brasil, Bahia, Palmeiras

Clado *Pelexia*

<i>Brachystele guayanensis</i> (Lindl.) Schltr. *	Teles, A. sn	F, E	Brasil, Goiás, Goiania
<i>Brachystele widgrenii</i> (Rchb.f.) Schltr.	Klein, J. 64	F, E	Brasil, Rio Grande do Sul
<i>Cyclopogon apricus</i> (Lindl.) Schltr.*	Smidt, E. C. sn	R, F, E	Brasil, Paraná, Curitiba
<i>Cyclopogon atroviridis</i> Barb. Rodr.*	Smidt, E. C. 939	F, E	Brasil, Paraná, Antonina
<i>Cyclopogon calophyllus</i> Barb.Rodr.*	Klein, J. sn	F, E	Brasil, Rio Grande do Sul, São Francisco de Paula
<i>Cyclopogon congestus</i> (Vell.) Hoehne *	Smidt, E. C. 1006	F	Brasil, Paraná, Fênix
<i>Cyclopogon congestus</i> (Vell.) Hoehne	Klein, J. 88	F, E	Brasil, Rio Grande do Sul
<i>Cyclopogon elatus</i> Lindl.*	Smidt, E. C. 202	F, E	Brasil, Bahia, Palmeiras
<i>Cyclopogon multiflorus</i> Schltr.*	Smidt, E. C. 1016	F, E	Brasil, Paraná, Piraquara
<i>C. multiflorus</i>	Smidt, E. C. 1045	F	Brasil, Paraná, Bocaiúva do Sul
<i>Cyclopogon</i> sp	Klein, J. 89	F, E	Brasil, Rio Grande do Sul
<i>Cyclopogon</i> sp	Klein, J. 86	F, E	Brasil, Rio Grande do Sul
<i>Cyclopogon</i> sp	Klein, J. 90	F, E	Brasil, Rio Grande do Sul
<i>Cyclopogon</i> sp	Klein, J. 109	F	Brasil, Rio Grande do Sul
<i>Hapalorchis micranthus</i> (Barb. Rodr.) Hoehne *	Klein, J. 93	F, E	Brasil, Rio Grande do Sul
<i>Hapalorchis</i> sp	Klein, J. 79	F	Brasil, Rio Grande do Sul
<i>Pelexia orthosepala</i> (Rchb.f. & Warm.) Schltr. *	Smidt, E. C. 768	F, E	Brasil, Bahia, Rio de Contas
<i>Pelexia itatiayae</i> Schltr.	Klein, J. 197	F, E	Brasil, Rio grande do Sul
<i>Pelexia</i> aff. <i>laxa</i> (Poepp. & Endl.) Lindl.	Smidt, E. C. 1020	F, E	Brasil, Paraná, Antonina
<i>Pelexia viridis</i> (Cogn.) Schltr.*	Smidt, E. C. 206	F, E	Brasil, Bahia, Palmeiras
<i>P. viridis</i>	Smidt, E. C. 710	F, E	Brasil, Bahia, Lençóis
<i>Sarcoglottis acaulis</i> (Sm.) Schltr.*	Smidt, E. C. 651	F, E	Brasil, Bahia, Itabuna
<i>Sarcoglottis ventricosa</i> (Vell.) Hoehne	Smidt, E. C. 956	F	Brasil, Paraná, Fênix
<i>Stigmatosema polyaden</i> (Vell.) Garay *	Klein, J. 91	F, E	Brasil, Rio Grande do Sul
<i>S. polyaden</i>	Smidt, E. C. sn	F	Brasil, Paraná, Curitiba
<i>Veyretia rupicula</i> (Garay) F.Barros *	Smidt, E. C. 668	F, E	Brasil, Bahia, Ibicoara
<i>Veyretia simplex</i> (Griseb.) Szlach	Smidt, E. C. sn	F, E	Brasil, Bahia, Palmeiras
<i>Veyretia sincorensis</i> (Schltr.) Szlach (2 indivíduos)	Smidt, E. C. 804	F, E	Brasil, Bahia, Mucugê
<i>V. sincorensis</i> *	Toscano de Brito, A.L.V. 2372	F, E	Brasil, Bahia, Mucugê

9.4 Análise Filogenética

Extração do DNA, amplificação e sequenciamento - O DNA foi extraído de amostras foliares através de uma versão modificada do protocolo 2X CTAB (brometo de trimetil-hexadecil amônio catiônico) (Doyle & Doyle, 1987). O DNA genômico total foi usado na amplificação da região do genoma nuclear ITS através da reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR). A amplificação do fragmento foi realizada em um volume final de 25µl contendo 1X buffer, 2,5mM MgCl₂, 0,2mM dNTPs, 0,5mM de cada primer, 10ng de BSA (albumina bovina sérica), 1,0 unidade de Taq DNA polymerase

(Phoneutria Biotec.Ser. Ltda, Belo Horizonte, Brasil) e 1 µl de DNA genômico. No mix de amplificação também foi acrescentado 20% de Betaína 5M e 0,5% de DMSO.

A região ITS (ITS1, gene 5.8S e ITS2) foi amplificada com o auxílio dos primers 92 (5' AAG GTT TCC GTA GGT GAA C 3') e 75 (5' TAT GCT TAA ACT CAG CGG G 3') descritos por Desfeaux *et al.* (1996) ou dos primers 17SE e 26SE (Sun *et al.*, 1994). A amplificação foi realizada através da técnica de PCR com um ciclo de desnaturação inicial de 94°C por 1 min, seguido de 40 ciclos de 30 seg a 94°C, 40 seg 49-55°C, 40 seg a 72°C, e um ciclo de extensão final de 72°C por 5 min.

Para o estudo filogenético foram utilizadas apenas 24 espécies (*tabela 1) que tinham a análise molecular e mais três espécies do grupo epífita (*Eurystyles cotyledon*, *Eurystyles (Pseudoeurystyles) lorenzti* e *Lankesterella ceracifolia*) que foram analisadas anatomicamente em (Bernal, 2013 cap.1). Foi construída uma matriz com auxílio do programa NEXUS Editor (Page, 2001). Os caracteres foram tratados como tendo peso igual e estados não ordenados (parcimônia de Fitch; Fitch, 1971). Na análise Máxima parcimônia, foi utilizado o programa TNT versão 1.1 (Goloboff *et al.*, 2000) através do *script* “*aquickie*”. Neste *script* é gerada uma árvore de consenso estrito, após busca heurística, com valores de suporte dos clados com 100 réplicas de bootstrap (Felsenstein, 1985) e índice de decaimento (Bremer, 1988) limitado a dez passos. Os índices das árvores resultantes foram obtidos a partir do programa TNT versão 1.1 (Goloboff *et al.*, 2000) através do *script* “*stats*” e pelo programa PAUP *4.0b10 (Swofford, 2002).

10 RESULTADOS

10.1 ANÁLISE ANATÔMICA

10.1.1 Raiz

A caracterização da estrutura anatômica das raízes dos taxa estudados é relativamente homogênea. *Tricomas radiculares*- unicelulares com parede contínua (lisa) ou descontínua (espiralada). Nos tricomas espiralados a parede se rompe em espiral permanecendo conectada por algumas faixas de microfibrilas (Fig. 1A-C).

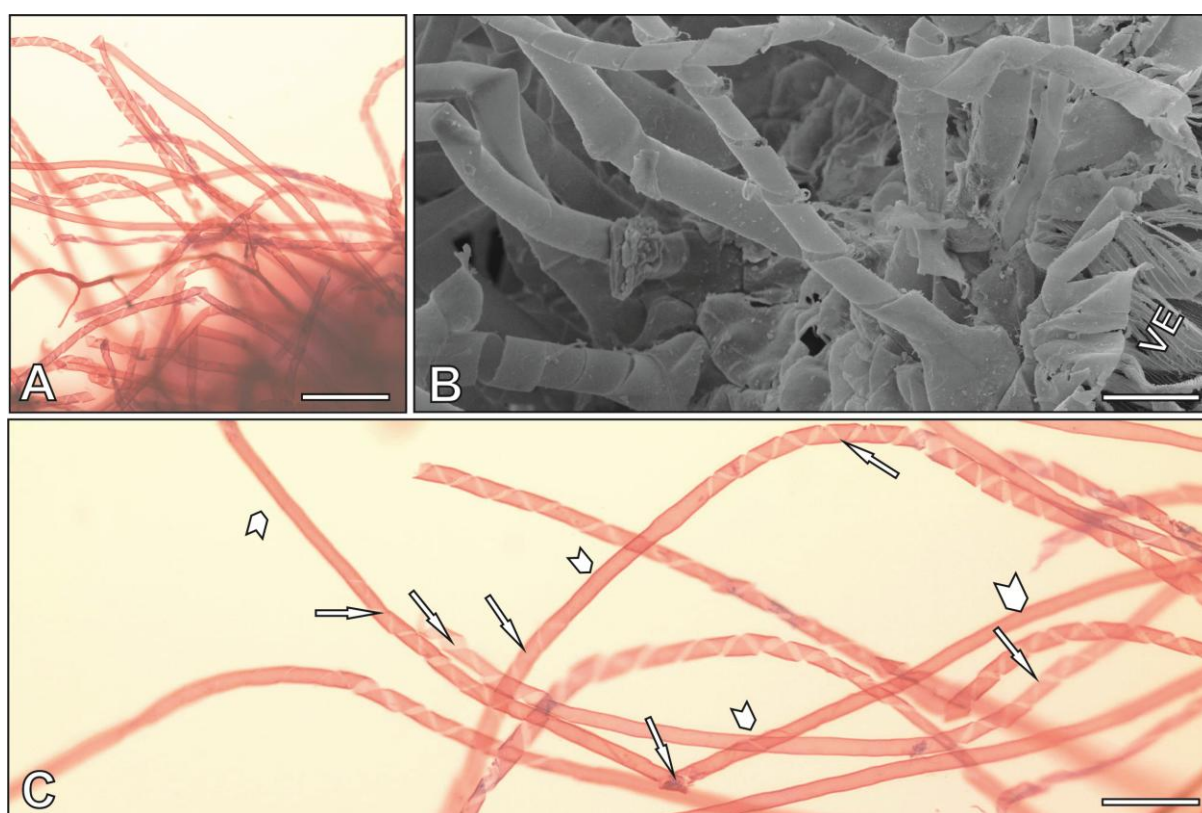


Figura 1- (A e C) análise em microscopia de luz. (B) análise em MEV. (A - C) *Cyclopogon* sp (voucher 090), tricomas espiralados distribuídos em meio aos tricomas comuns; escalas = 200 μ m e 50 μ m, respectivamente. (C) detalhe (setas) das partes espiraladas no mesmo tricoma e detalhe (cabeça de seta) da parede continua no mesmo tricoma; escala = 100 μ m.

A maioria das espécies analisadas apresentou inúmeros tricomas dos tipos, simples e espiralados (Fig. 2A). As exceções foram *Skeptrostachys congestiflora* e *Veyretia sincorensis* sem tricomas e as espécies do gênero *Brachystele*, *S. lanceolata* e *Pelexia orthosepala* que

apresentaram somente tricomas simples e esparsos. *Velame*- com exceção de *Sauroglossum nitidum* com 7 a 10 camadas (Fig. 2B), *Prescottia stachyodes* com três e *Eltroplectris calcarata* com duas camadas, todas as outras espécies apresentaram uma camada com células, isodiamétricas ou ainda comprimidas ou alongadas radialmente (Fig. 2C). *Tilossomo*- com exceção de *Sauroglossum nitidum* que apresentou o tipo baculado (Fig. 2D) todas as outras espécies apresentaram o tipo lamelado (Fig. 2E). *Exoderme*- com paredes delgadas apresentando, na maioria das espécies, espessamento escalariforme (Fig. 2F). *Córtex*- quase sempre amilífero e com micorrizas (Fig. 2G). *Amiloplasto*- do tipo espirantossomo em todas as espécies (Fig. 2H). *Espaço supraendodermal*- espaços longos dispostos radialmente na camada adjacente à endoderme foram observados somente em *Veyretia sincorensis* (Fig. 2I). As demais espécies apresentaram espaços considerados curtos ou até mesmo ausentes. *Números de polos de xilema/floema*- geralmente acima de cinco (Fig. 2I), somente em *Cyclopogon atroviridis* foram registrado três. Idioblastos com ráfides ocorrem em todas as espécies.

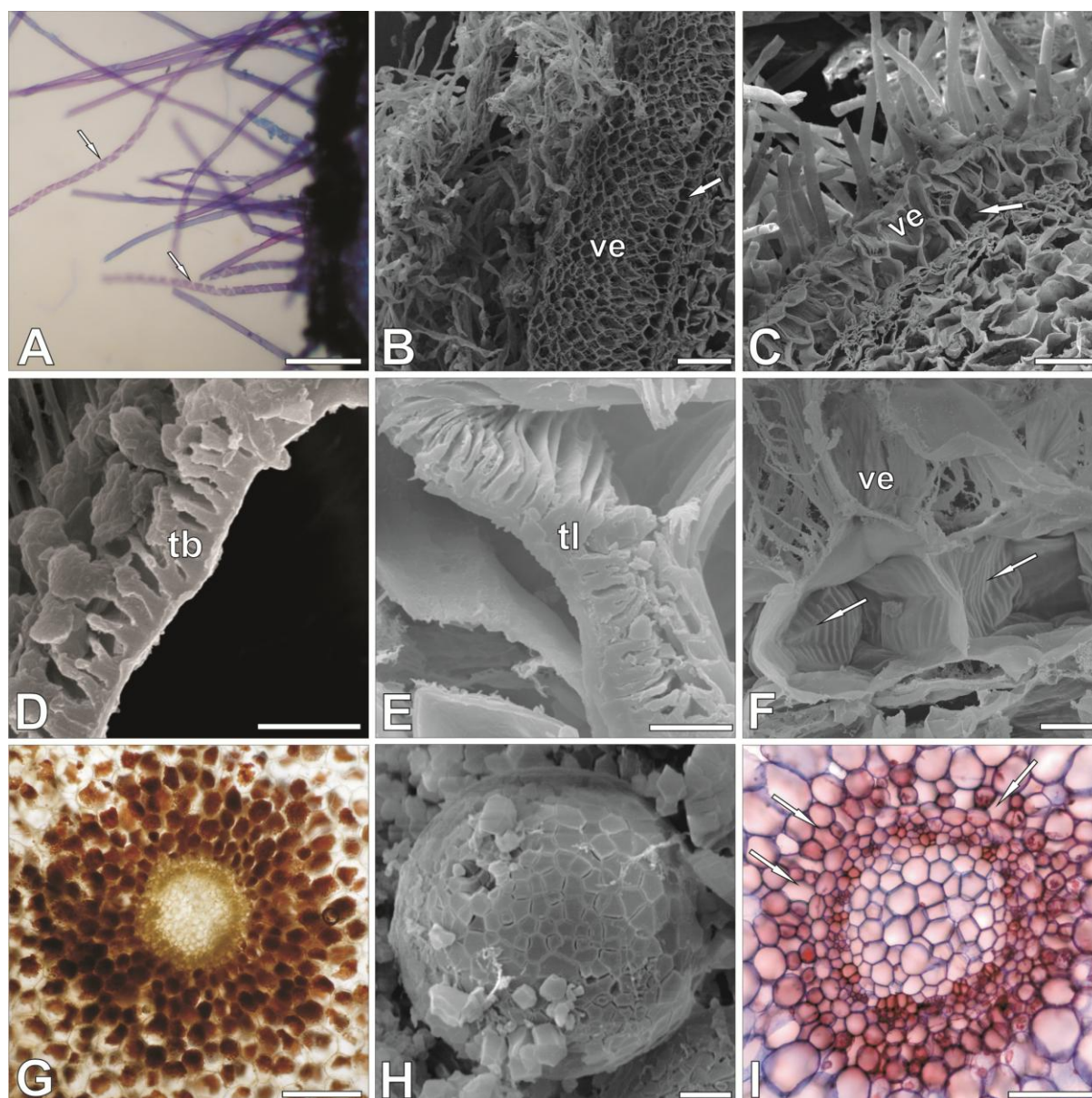


Figura 2- Caracteres anatômicos da raiz em espécies da tribo Cranichideae. (A – I) secções transversais. (A, G, I) microscopia de luz; as demais, microscopia eletrônica de varredura. (A) *Cyclopogon* sp (090), tricomas espiralados (setas) e simples; escala = 200 µm. (B, C) detalhes do velame (ve) e exoderme (seta) em *Sauroglossum nitidum* (B), *Cyclopogon* sp (voucher 090) (C); escalas = 200 e 100 µm, respectivamente. (D) *Sauroglossum nitidum*, detalhe do tilossomo baculado (Tb); escala = 5 µm. (E) *Eltroplectris calcarata*, detalhe do tilossomo lamelado (tl); escala = 5 µm. (F, G) *Cyclopogon multiflorus*, detalhe da exoderme com espessamento escalariforme (setas), velame (ve) em (F); parênquima amilífero em (G); escalas = 20 e 200 µm, respectivamente. (H) *Cyclopogon* sp (voucher 090), detalhe de um espirantossomo; escala = 2 µm. (I) *Veyretia sincorensis*, espaços supraendodermiais (setas); escala = 200 µm.

10.1.2 *Pecíolo/Bainha*

Corte transversal: *formato*- foram caracterizados quatro tipos de pecíolos (em U, alado, cordiforme e cilíndrico) e bainha em formato de meia lua.

As espécies que possuem pecíolo em U predominam em 50% do total (Fig. 3A). O restante das espécies apresenta bainha em formato de meia lua (Fig. 3B) e pecíolo alado (Fig. 3C). Idioblastos com ráfides e xilema binário foram observados em todas as espécies (Fig. 3B). A quantidade de feixes vasculares é variável entre as espécies. As *Spiranthinae* terrestres apresentam uma variação entre 7 a 11 feixes, enquanto que as espécies do grupo externo apresentam de 12 a 16 feixes.

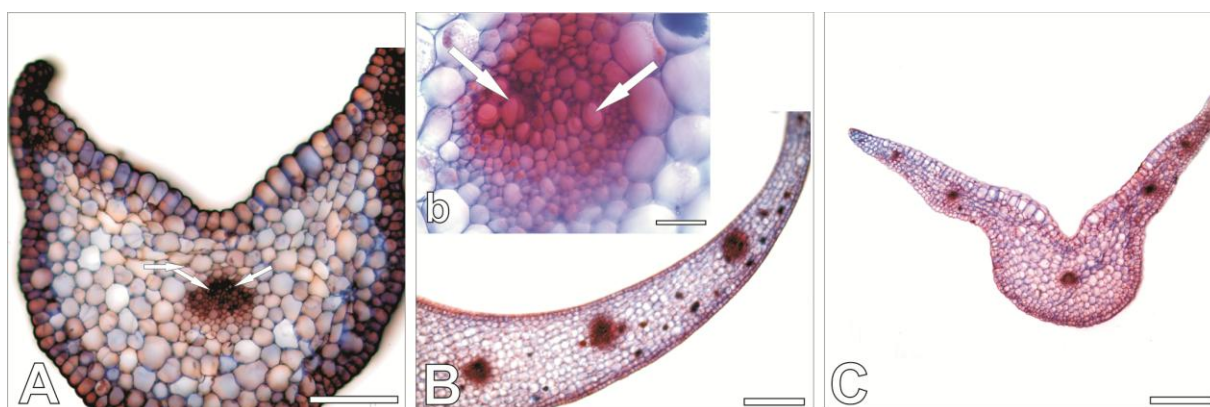


Figura 3- Secções transversais. (A – C) microscopia de luz. (A) *Hapalorchis* sp, pecíolo em U com xilema binário no feixe vascular (setas); escala = 200 μm . (B, b) *Sacoila lanceolata*, bainha em meia lua, (b) detalhe do xilema binário (setas); escala = 500 e 100 μm , respectivamente. (C) *Cyclopogon atroviridis*, pecíolo alado; escala = 500 μm .

10.1.3 *Folha*

Superfície: glabra em todas as espécies. Em vista frontal as células, em ambas as faces, são predominantemente poligonais, geralmente isodiamétricas (Fig. 4A) ou com paredes sinuosas (predominante na face abaxial) (Fig. 4B) e células retangulares a quadradas paralelas à nervura central (Fig. 4C). *Estômatos*- não há um padrão característico. Podem ser

dos tipos, anisocíticos e tetracíticos ocorrendo conjuntamente em todas as espécies ou ainda diacíticos em *Baskervilla paranaensis*, *Brachystele widgrenii*, *Platythelys paranaensis*. Os estômatos prevalecem na face abaxial, podendo ocorrer também em ambas às faces como em *Brachystele widgrenii*, *Cyclopogon apricus*.

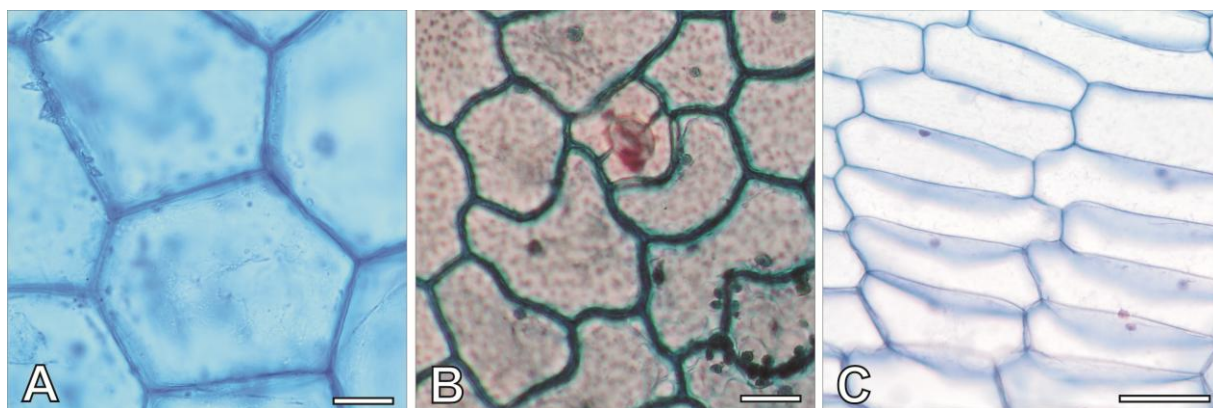


Figura 4- Vista frontal da folha. (A) *Cyclopogon calophyllus*, face adaxial, células poligonais; escala = 200 μm . (B) *Prescottia stachyodes*, face abaxial, células com paredes sinuosas; escala = 50 μm . (C) *Pelexia viridis*, face adaxial, células retangulares; escala = 100 μm .

Secção transversal: *Cutícula*- delgada, lisa ou verrucosa (Fig. 5A). *Células epidérmicas*- geralmente aquíferas, com paredes anticlinais finas, podendo ser papilosas (Fig. 5B, C). Eventualmente ocorrem células consideradas não aquíferas (*Cyclopogon apricus*, *Skeptrostachys* sp e as duas espécies *Brachystele*) (Fig. 5D). *Parênquima clorofiliano*- a maioria das espécies apresenta mesofilo com parênquima regular com 2 a 10 camadas de células. Mesofilo heterogêneo, contendo parênquima paliádico e esponjoso, foi registrado apenas em *Brachystele widgrenii* e *Pelexia orthosepala* (Fig. 5D). *Feixes vasculares*- dispostos linearmente no mesofilo com bainha parenquimática e sem estegmata. Idioblastos com ráfides em todas as espécies. *Nervura central*- a superfície da folha, em secção transversal, varia em côncavo convexo, linear convexo e linear. O padrão “côncavo convexo” (Fig. 5E) predominou na maioria das espécies, seguido pelo padrão “linear” (Fig. 5F). O padrão “linear convexo” ocorre somente em *Brachystele widgrenii*. *Feixe vascular da nervura central*- sempre com xilema binário (dois polos xilemáticos separados por parênquima) (Fig.

5E, F). *Bordo*- pode ser clorofilado (com parênquima clorofiliano), colenquimático (com células de paredes espessadas) ou epidérmico (quando não há mesofilo e somente células epidérmicas). O clorofilado foi registrado para a maioria das espécies (Fig. 5G). *Prescottia stachyodes* e as duas espécies de *Skeptrostachys* apresentam bordos colenquimáticos (Fig. 5H). *Brachystele widgrenii* e *Sauroglossum nitidum* apresentam bordos epidérmicos (Fig. 5I).

10.1.4 Escapo

Superfície: *tricomas*- as espécies *Brachystele guayanensis*, *Prescottia stachyodes* e as *Eltroplectris* e *Skeptrostachys* possuem escapo glabro. Tricomas unisseriados, de tamanho variável, foram registrados em *Veyretia rupicola* e em *Veyretia sincorensis* (Fig. 6A). As demais espécies apresentam tricomas do tipo capitado com pedicelo que varia em número de células (Fig. 6B, C). Tricoma capitado com cabeça pluricelular foi identificado somente em *Microchilus arietinus* (Fig. 6D).

Secção transversal: *Cutícula*- geralmente fina com estriações ou verrugas. Células epidérmicas geralmente arredondadas ou um pouco alongadas e com as paredes finas. *Córtex*- com 2 a 4 camadas de células parenquimáticas (Fig. 6E) e com presença de idioblastos com ráfides. *Sistema vascular*- circundado por um anel de células esclerificadas formando de duas a seis camadas, dependendo da espécie (Fig. 6E). O estelo é do tipo atactostelo. *Feixes vasculares colaterais*- variam de três a mais de 40 feixes dispersos no parênquima fundamental, podendo ocorrer algumas células esclerificadas, (Fig. 6F). O teste de detecção de amido foi negativo para todas as espécies.

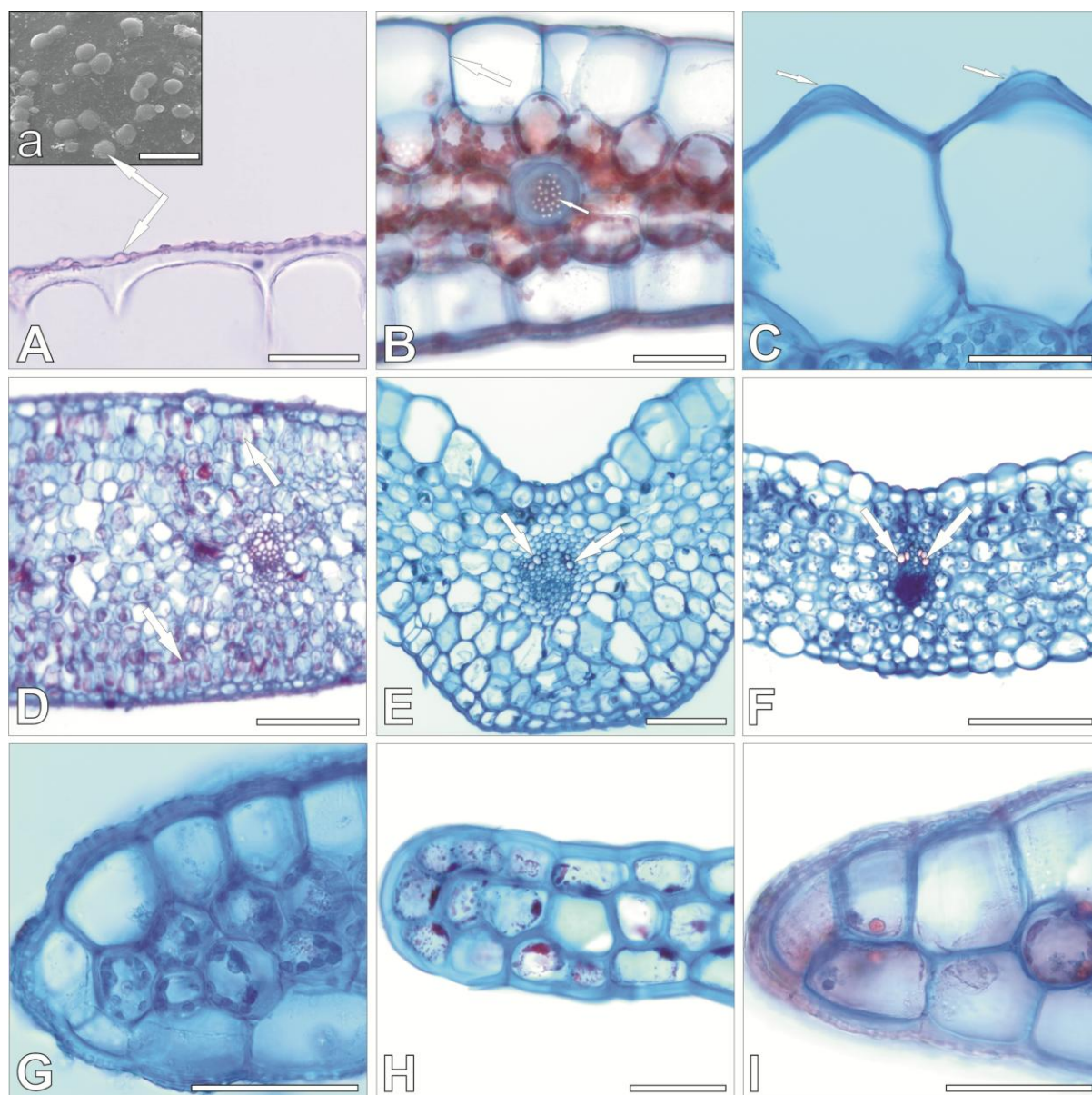


Figura 5- Secções transversais de folhas de espécies de Cranichideae. (A, a em MEV) *Prescottia stachyodes*, cutícula verrucosa; escala = 250 pm e 5 μ m. (B) *Sauroglossum nitidum*, epiderme com células aquíferas túrgidas com paredes anticlinais retas (seta maior) e idioblastos com ráfides (seta menor); escala = 100 μ m. (C) *Cyclopogon calophyllus*, epiderme aquífera com parede anticlinal sinuosa e parede periclinal externa convexa (setas); escala = 500 pm. (D) *Braschystele* sp, limbo com mesófilo heterogêneo com parênquima paliçádico (setas) em ambas as faces; escala = 100 μ m. (E) *C. calophyllus*, nervura mediana com superfície côncavo-convexa e detalhe do xilema binário (setas); escala = 200 μ m. (F) *Microchilus arietinus* nervura mediana com superfície linear; escala = 200 μ m. (G) *Cyclopogon* sp (voucher 089), detalhe do bordo clorofilado; escala = 500 pm. (H) *Skeptrostachys* sp, detalhe do bordo colenquimático; escala = 100 μ m. (I) *Sauroglossum nitidum*, detalhe do bordo epidérmico; escala = 500 pm.

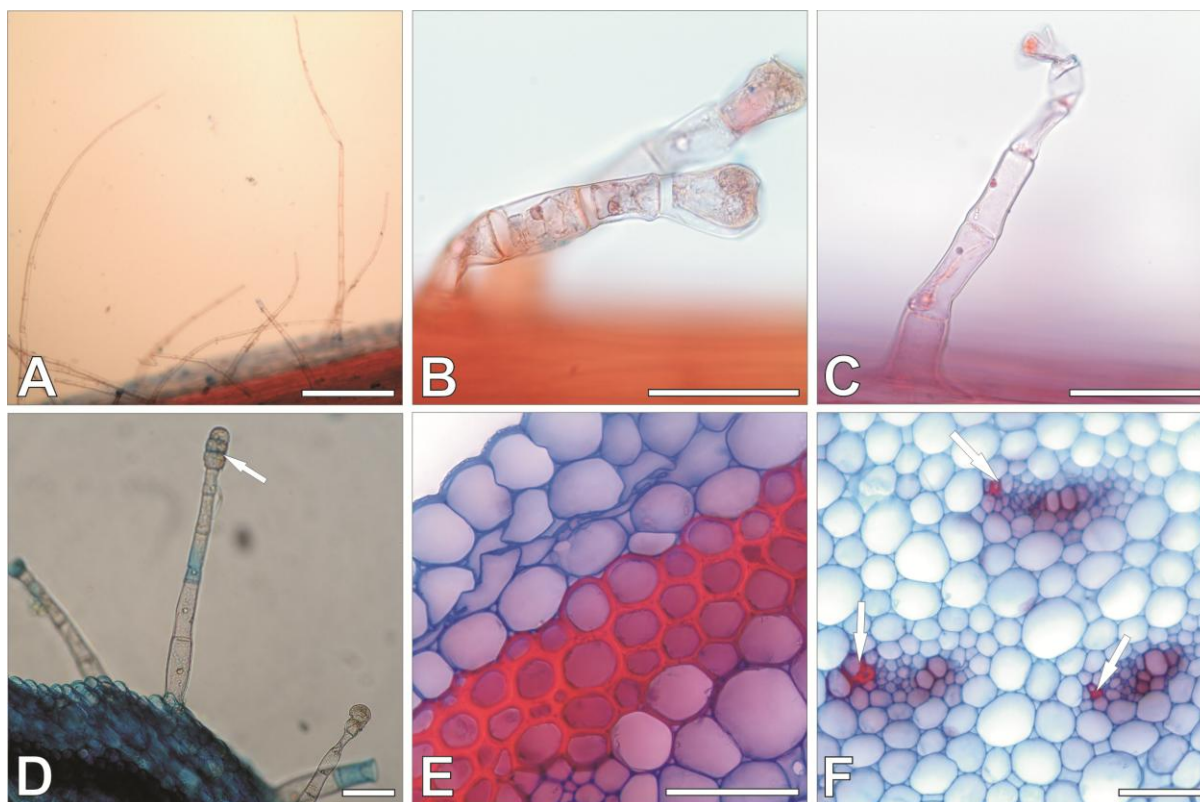


Figura 6- Caracteres anatômicos do escapo floral em espécies da tribo Cranichideae. (A) *Veyretia sincorensis*, tricomas unisseriados com extremidade afilada, curtos e longos; escala = 500 µm. (B, C) *Hapalorchis* sp e *Cyclopogon atroviridi*, respectivamente, tricomas capitados; escalas = 500 µm. (D) *Microchilus arietinus* tricoma capitado com cabeça pluricelular (seta); escala = 100 µm. (E) *Cyclopogon congestus* (voucher 088), detalhe da bainha esclerificada; escala = 500 µm. (F) *V. sincorensis*, detalhe de células esclerificadas (setas) junto aos feixes vasculares; escala = 100 µm.

10.2 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Foram identificados 33 caracteres anatômicos (32 qualitativos e um quantitativo) (tabela 2). Os estados de caractere foram constituídos de 11 caracteres binários e 22 multiestados para construção da matriz morfológica (apêndice 2). Os resultados das análises nas três modalidades (morfológica, ITS, combinada) estão representados na tabela 3.

A resolução da árvore morfológica isolada apresenta uma politomia e não resolve as espécies terrestres. No entanto, o grupo epífita aparece como grupo monofilético (ID=1) e é representado pela sinapomorfia do tipo do estelo do escapo floral (caractere 33). Neste grupo *Eurystyles lorenzii* (*Pseudoeurystyles*) é irmão de *Eurystyles/Lankesterella* (BP=59, ID= 1), e

este último clado é representado pelas seguintes sinapomorfias: ausência de pecíolo (caractere 10), presença de tricomas simples no bordo foliar (caractere 14) e a presença de tricomas simples no escapo floral (caractere 28).

A resolução da árvore molecular evidencia que a subtribo *Spiranthinae* é monofilética e fortemente sustentada (BP=100, ID=10). O restante das espécies constitui três clados monofiléticos dentro da subtribo *Spiranthinae*. O clado epífito é sustentado por (BP=86, ID=4), com *Eurystyles* (*Pseudoeurystyles*) *lorenzii* como grupo irmão de *Eurystyles/Lankesterella*, este último sustentado por (BP=87, ID=4). O clado *Stenorrhynchos* apresenta *Thelyschista ghyllanyi* não resolvida, com o restante das espécies formando um grupo monofilético com (BP=66, ID=1), representado por cinco espécies, em que *Skeptrostachys* é grupo irmão de *Sacoila lanceolata* com (BP=100, ID=10) e *Mesadenella cuspidata* é irmão de *Eltroplectris* sustentado por (BP=79, ID=2). O restante das espécies representa o clado *Pelexia* que também é monofilético, fortemente sustentado (BP=100, ID=10). Dentro do clado *Pelexia* há dois grupos, um formado pelas espécies *Sarcoglottis* que é irmão de *Pelexia* fortemente sustentado (BP=100, ID=4) e o outro clado formado por 11 espécies fragilmente sustentado (BP=53, ID=1) que incluem espécies dos gêneros *Cyclopogon*, *Brachystele*, *Hapalorchis*, *Stigmatosema* e *Veyretia*.

Na análise filogenética combinada (morfológica + ITS) a subtribo *Spiranthinae* continua monofilética e fortemente sustentada (BP=100, ID=10). O clado epífito apresenta-se com maior suporte (BP=96, ID=7) e *Eurystyles/Lankesterella* também, com (BP=98, ID=8). O clado *Stenorrhynchos* é um grupo polifilético com *Thelyschista ghyllanyi* e *Mesadenella cuspidata* não resolvida. Porém, pode ser representado pelos seguintes caracteres diagnósticos: cutícula lisa na face abaxial (17) e epiderme aquífera papiliforme na face adaxial (23). Dentro do clado *Stenorrhynchos*, *Eltroplectris* forma um clado monofilético (BP=96) representado por caracteres diagnósticos como, por exemplo, duas camadas de

velame, e *Skeptrostachys* é grupo irmão de *Sacoila lanceolata* com suporte (BP=100, ID= 10) e apresenta caracteres diagnósticos como região da nervura central linear e células epidérmicas poligonais. O clado *Pelexia* forma um único grupo monofilético fortemente sustentado (BP=100, ID=10) com alguns caracteres anatômicos diagnósticos, como por exemplo, 7 a 11 feixes vasculares do pecíolo (caractere 12), folha com cutícula verrucosa na face abaxial (caractere 17), formato da região da nervura central côncavo convexo (27) e tricomas capitados no escapo floral (30). Dentro do clado *Pelexia* há dois grupos, um formado pelas espécies *Sarcoglottis* que é irmão de *Pelexia* sustentado por (BP=100, ID=4) que pode ser representado por caracteres diagnósticos, como escapo floral com tricomas capitados, bainha esclerificada e disposição atactostélica dos feixes vasculares. O outro clado formado por 11 espécies fragilmente sustentado (BP=55, ID=1). Dentro deste clado são formados três clados monofiléticos em que o gênero *Cyclopogon* é polifilético (Fig. 7).

Tabela 2. Enumeração dos caracteres e seus estados, na raiz, folha e escapo floral.

1.	Raiz tricomas: (0) ausente (1) simples (2) simples e espiralados;
2.	Raiz velame tipo: (0) <i>spiranthes</i> (1) sem espessamento sem poros;
3.	Raiz n. de camadas velame: (0) uma camada (1) duas camadas (2) três ou mais camadas;
4.	Raiz tilossoma: (0) ausente (1) presente;
5.	Raiz tilossoma tipo: (0) lamelado (1) baculado;
6.	Raiz exoderme: (0) sem espessamento (1) espessamento escalariforme;
7.	Raiz amido: (0) ausente (1) espirantossoma;
8.	Raiz espaço supraendodermal: (0) ausente (1) curto (2) longo;
9.	Raiz n. de arcos xilema/floema: (0) até cinco (1) mais de cinco;
10.	Pecíolo: (0) ausente (1) presente;
11.	Pecíolo formato: (0) cordiforme (1) formato letra U (2) cilíndrico (3) alado (4) meia lua com sem nervura proeminente;
12.	Pecíolo nervura central xilema: (0) unitário (1) binário;
13.	Pecíolo número de feixes vasculares: (0) 3 a 5 feixes (1) 7 a 11 feixes (2) 12 a 16 feixes (3) 20 feixes;
14.	Folha papilas no bordo: (0) ausente (1) presente;
15.	Folha tricoma simples no bordo: (0) ausente (1) presente;
16.	Folha cutícula: (0) delgada (1) espessa;
17.	Folha face adaxial cutícula tipo: (0) lisa (1) verrucosa (2) estriada;
18.	Folha face abaxial cutícula tipo: (0) lisa (1) verrucosa (2) estriada;
19.	Folha estômato distribuição: (0) hipoestomática (1) anfiestomática;
20.	Folha epiderme face adaxial (vista paradérmica) formato das células: (0) poligonais (1) retangulares paralelas nervura central (2) sinuosas (3) irregulares;
21.	Folha epiderme face abaxial (vista paradérmica) formato das células: (0) poligonais (1) sinuosas (2) retangulares paralelas nervura central (3) irregulares;
22.	Folha secção transversal bordo tipo: (0) clorofilado (1) colenquimático (2) epidérmico;
23.	Folha secção transversal epiderme da face adaxial tipo: (0) células aquíferas paredes anticliniais retas (1) células aquíferas paredes anticliniais sinuosas (2) células aquíferas conicais e paredes anticliniais sinuosas (3) células aquíferas conicais com paredes anticliniais retas (4) não aquífera;
24.	Folha secção transversal epiderme da face abaxial tipo: (0) células aquíferas com paredes anticliniais retas (1) células aquíferas com paredes anticliniais sinuosas (2) não aquífera;
25.	Folha secção transversal mesófilo parênquima tipo: (0) paliçádico (1) regular (2) esponjoso;
26.	Folha região da nervura central: (0) Linear (1) linear convexa (2) côncavo convexa;
27.	Escapo tricoma simples: (0) ausente (1) presente;
28.	Escapo tricoma unisseriado: (0) ausente (1) com extremidade afilada (2) com a extremidade obtusa;
29.	Escapo tricoma capitado: (0) ausente (1) com cabeça unicelular (2) com cabeça pluricelular;
30.	Escapo bainha esclerificada: (0) ausente (1) presente;
31.	Escapo células esclerificadas: (0) ausente (1) presente;
32.	Escapo estelo tipo: (0) atactostelo (1) eustelo.

Tabela 3- resultados das análises cladísticas morfológica, ITS e combinada (morfológica+ITS).

	Morfológica	ITS	Combinada
Número de taxa	27	27	27
Número de caracteres	32	764	796
Caracteres variáveis	05	113	118
Caracteres parcimoniosamente informativos	24	223	247
% de caracteres informativos	72.72	29.19	30.99
Comprimento da árvore	85	698	808
Número de árvores retidas	113	5	2
Índice de consistência (IC)	0.35	0.64	0.62
Índice de retenção (IR)	0.10	0.67	0.64

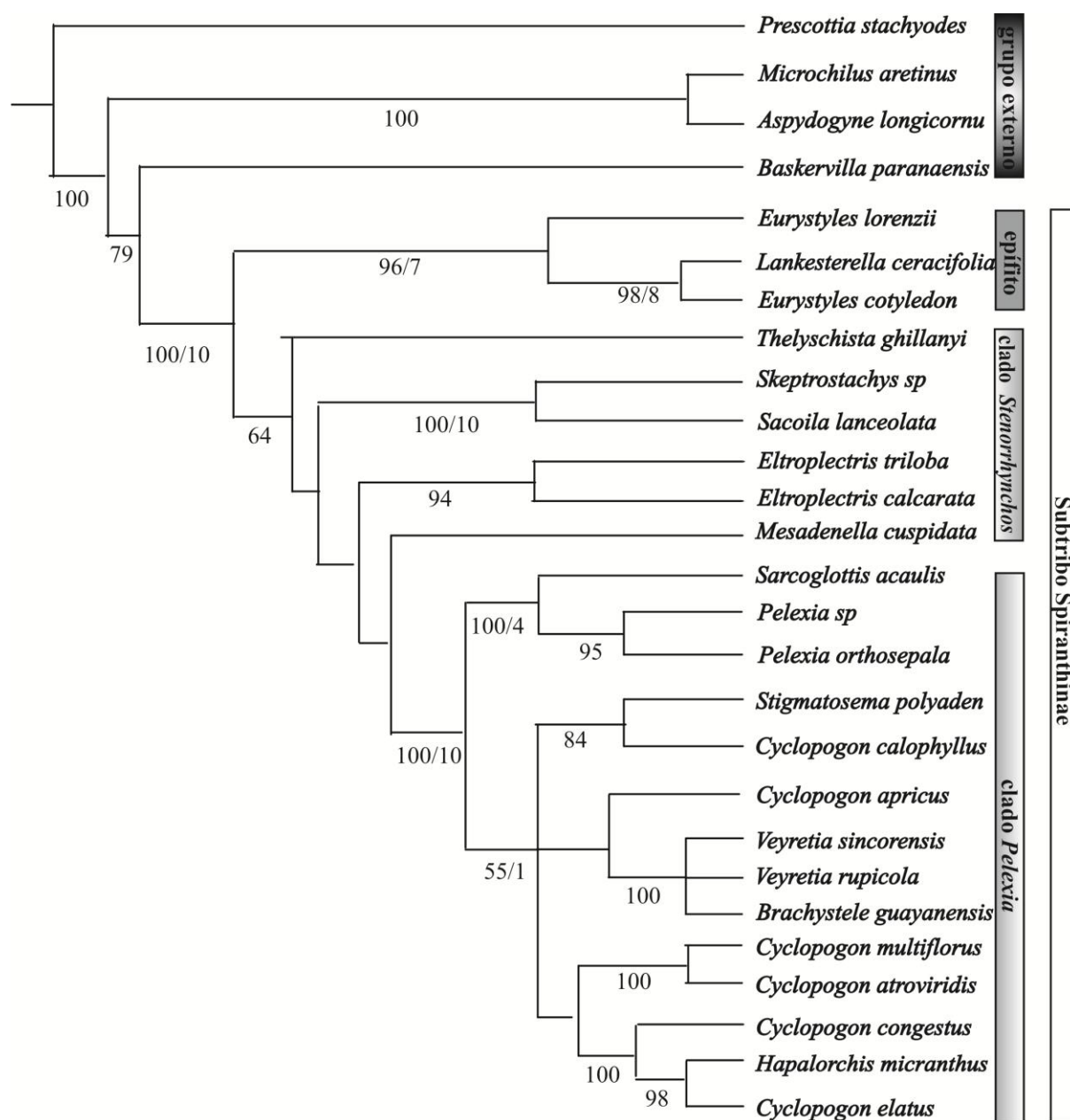


Figura 7- Árvore de consenso estrito encontrada pela busca heurística dos caracteres anatômicos e moleculares combinados (valores sob os ramos correspondem a Bootstrap ≥ 50 e Índice de Decaimento limitado a 10 passos).

11 DISCUSSÃO

A maioria dos caracteres anatômicos da raiz assemelha-se aos já registrados para a subtribo Spiranthinae (Porembski & Barthlott, 1988; Stern *et al.*, 1993; Figueroa *et al.*, 2008).

Porém, tricoma radicular espiralado, registrado em (Bernal, 2013 cap.1) é representativo para a tribo Cranichideae, conforme sua reconstrução na árvore filogenética (Fig. 8A).

Com relação ao velame do tipo spiranthes, indicado como uma sinapomorfia para Spiranthinae (Porembski & Barthlott, 1988; Stern *et al.*, 1993; Figueroa *et al.*, 2008), na análise cladística morfológica observa-se uma possível perda desta característica em *Lankesterella* (Fig. 8B). Além disso, foi registrado variação no número de camadas: o velame com duas camadas teve origem independente duas vezes, em *Eurystyles* e *Eltroplectris calcarata*. *Sauroglossum nitidum*, que não entrou na análise filogenética, apresentou 10 camadas.

A presença de tilossomo do tipo lamelado registrada para quase todas as espécies, exceto para *Sauroglossum nitidum*, fortalece o estudo de Figueroa *et al.* (2008) que evidenciaram, pela primeira vez, esta estrutura para Cranichideae. Figueroa *et al.* (2008) sugerem tilossomo lamelado como uma sinapomorfia para Spiranthinae. No entanto, este caractere é variável, como observado em *S. nitidum*, com o tipo baculado, que não entrou na análise filogenética. Essa variação é observada também em nível de tribo. Uma vez que *Prescottia stachyodes* (subtribo Prescottinae) pode apresentar o tipo lamelado (registrado neste estudo) ou baculado registrado por Figueroa *et al.* (2008).

Exoderme com espessamento escalariforme foi registrada na maioria das espécies, concordando com Stern *et al.* (1993) e Figueroa *et al.* (2008) que indicaram essa característica representativa para Cranichideae. Espirantossomo (amido especializado) presente em todas as espécies analisadas, foi sugerido por Stern *et al.*, (1993a, 1993b) e Salazar *et al.* (2003) como uma sinapomorfia para a tribo Cranichideae. A análise cladística indica uma possível reversão neste caractere para o estado de caractere (amido composto) nas espécies de *Lankesterella* (Fig. 9A). Espaços curtos na região supraendodermal foram registrados na maioria das espécies terrestres de Spiranthinae. Comparando com o estudo de Figueroa *et al.* (2008),

foram identificadas algumas discrepâncias quanto ao tamanho e presença ou ausência desse caractere, indicando que é inviável para inferir significância filogenética.

Este é o primeiro estudo que aborda caracteres do pecíolo em *Spiranthinae* na tentativa de alavancar sinapomorfias para esta subtribo. O pecíolo em formato de U é um caractere diagnóstico para *Spiranthinae*. Porém esta característica também é observada em *Baskervilla paranaensis* (Cranichidinae) (Fig. 9B). O número de feixes vasculares (caractere 12) aparece como um caractere diagnóstico em que o estado de caractere (7 a 11 feixes) é representativo para as espécies terrestres de *Spiranthinae* em oposição as espécies do grupo externo que apresentaram um número de feixes entre 12 a 16.

A máxima parcimônia do tipo de ornamentações da cutícula, na face abaxial da folha (caractere 17) aponta diferentes estados de caractere diagnosticando os três clados: cutícula verrucosa para o clado *Pelexia*; cutícula lisa para *Stenorrynchos* e cutícula estriada como sinapomorfia para o clado epífito (Fig. 10A). Stern *et al.* (1993b) descreveram para Cranichideae cutícula lisa ou rugosa a rugulosa (= estrias epicuticulares) para varias espécies, ou ainda uma cutícula multipapilada (= verrucosa) em *Goodyera oblongifolia* Raf. porém não apresentaram ilustrações para seu reconhecimento.

Epiderme aquífera é um caractere diagnóstico para Cranichideae, podendo ocorrer distensão na parede periclinal externa, formando papilas. Descrição semelhante da parede periclinal externa (formato cônico) foi feita por Stern *et al.* (1993) para *Ludisia discolor* A. Rich. e para outras espécies, porém com proeminência menos expressiva.

Caracteres foliares pouco variáveis como células da epiderme poligonais e isodiamétricas em vista frontal, cutícula delgada, mesofilo homogêneo e xilema binário são comuns à maioria das espécies de Cranichideae. Xilema binário foi considerado característica representativa de Cranichideae por Stern *et al.* (1993b). Segundo Salazar *et al.* (2003), que também observou este caractere em espécies de Diurideae, este poderia representar uma

sinapomorfia para as duas tribos. Este é um caractere que pode ser considerado conservativo, uma vez que se observou que não há alteração ao longo da folha. O mesmo número de pólos xilemáticos foi registrado no pecíolo e na nervura mediana ao longo de todo o limbo. O xilema binário apesar de ser sugerido por Stern *et al.* (1993b) e Salazar *et al.* (2003) como possível sinapomorfia para Diurideae-Cranichideae, a máxima parcimônia deste caractere revela que houve alteração em seu estado. O estado de caractere xilema unitário teve origem em um ancestral comum mais recente de *Lankesterella* e *Eurystyles* e xilema trinário é autopomórfico para *Eurystyles* (*Pseudoeurystyles*) *lorenzii*. O padrão da região da nervura central (caractere 27) em que o padrão côncavo convexo é representativo para o clado *Pelexia*, indica que este é mais uma opção na busca de caracteres diagnósticos.

A análise cladística dos seis caracteres levantados do escapo floral aponta que todos são diagnósticos, sendo três destes com 100% de consistência, como o estado de caractere tipo de estelo (eustelo) (caractere 33) que é uma sinapomorfia para o grupo epífito. A presença de tricomas simples (caractere 28) e a ausência de bainha esclerificada (caractere 31) são sinapomorfias para o clado *Eurystyles/Lankesterella*. Tricoma capitado com cabeça unicelular é um caractere representativo para o clado *Pelexia*. Ausência de tricoma capitado no clado *Stenorhynchus* pode ser uma condição plesiomórfica. A presença da bainha esclerificada e o estelo do tipo atactostelo são caracteres diagnósticos para Cranichideae. Este resultado evidencia que o escapo floral pode ser mais uma opção na busca de sinapomorfias para grupos complexos.

A análise morfológica não resolveu os gêneros terrestres de Spiranthinae sugerindo que os caracteres anatômicos isolados foram insuficientes para inferir relações entre as espécies. Isto não é incomum, como visto em Dendrobiinae (Morris *et al.*, 1995), Oncidiinae (Stern & Carlswald, 2006). Porém, quando estes dados anatômicos são interpretados juntamente com dados moleculares (no caso ITS) dão um maior suporte a hipótese de

monofiletismo dos clado *Pelexia* (Salazar *et al.*, 2003; Pridgeon *et al.*, 2003). Alguns caracteres anatômicos diagnósticos podem ser representativos deste clado, como por exemplo: número de feixes vasculares do pecíolo (7 a 11 feixes) (caractere 12), folha com cutícula verrucosa na face abaxial (caractere 17), formato da região da nervura central côncavo convexo (27) e tricomas capitados no escapo floral (30).

Os dados anatômicos observados neste estudo também corroboram hipóteses sinapomórficas pré-estabelecidas em níveis de tribo e subtribo como, por exemplo, a presença de tilossomo lamelado (sinapomorfia para a subtribo *Spiranthinae*) de acordo com Figueroa *et al.* (2008); velame com uma ou duas camadas do tipo *spiranthes* (Porembski & Barthlott, 1988; Stern *et al.*, 1993b); o formato poligonal das células epidérmicas e o xilema binário da nervura mediana (Stern *et al.*, 1993b; Salazar *et al.*, 2003). Além disso, houve a confirmação de certos caracteres foliares estabelecidos para o grupo, como a ausência de feixe de fibras, estegmatas e bainha de esclerênquima circundando os feixes vasculares (Stern *et al.*, 1993b; Pridgeon *et al.*, 2003).

Novos caracteres diagnósticos foram identificados em nível de tribo e subtribo como, tricomas radiculares espiralados, presença de pecíolo, células epidérmicas aquíferas, padrão da região da nervura central e caracteres do escapo floral, que podem fortalecer as relações entre diferentes subtribos. Como futuras perspectivas no estudo de evolução morfológica em *Spiranthinae*, a inclusão de dados moleculares de mais espécies, assim como o aumento no número de regiões sequenciadas, abrangendo também o genoma plastidial devem ser incorporados a estudos anatômicos. Esse tipo de análise, como no presente estudo, fornece valiosa informação para o entendimento de grupos de taxonomia complexa, devido à supervalorização de caracteres florais, hoje sabidamente homopláticos pelas convergências evolutivas em função dos seus respectivos polinizadores.

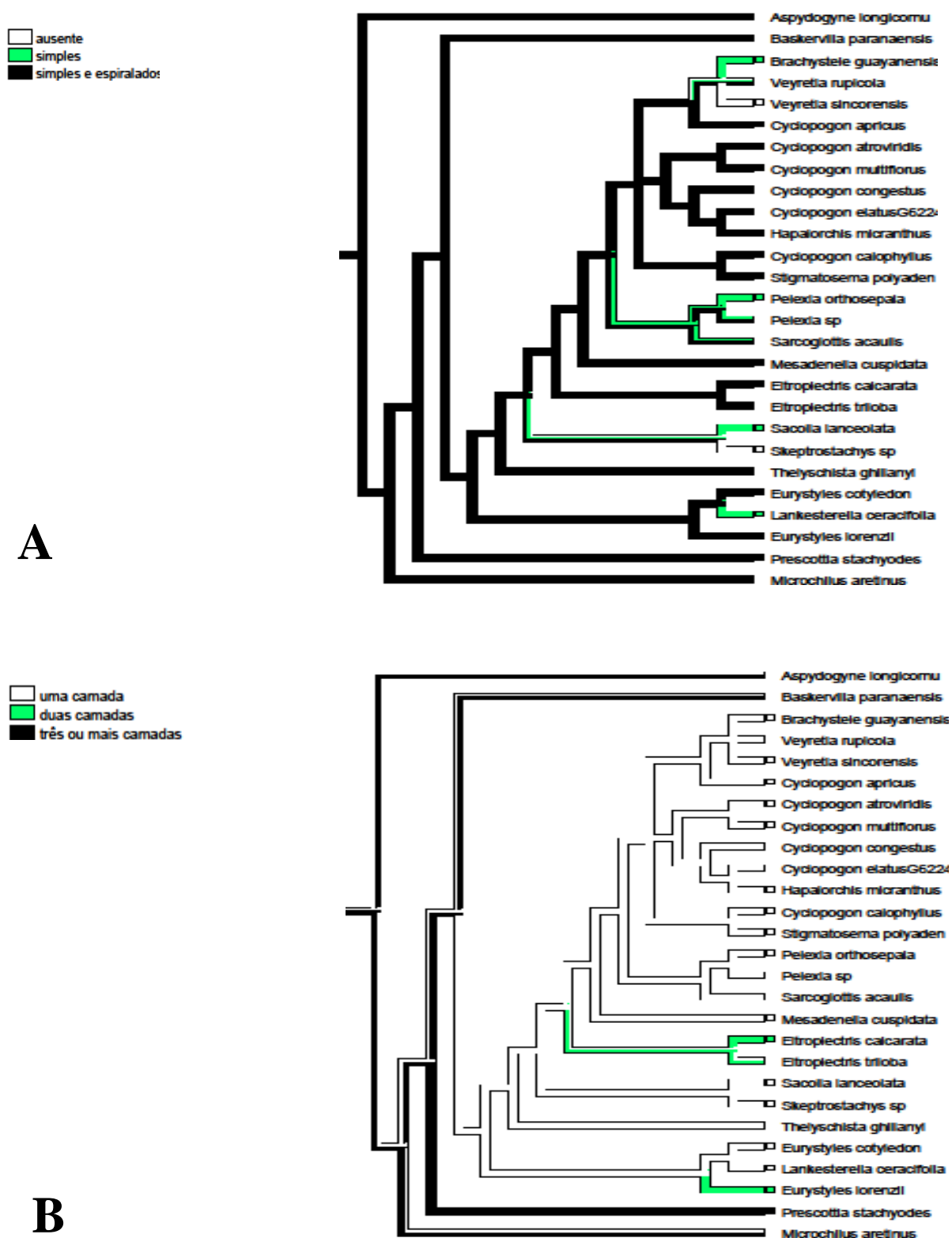
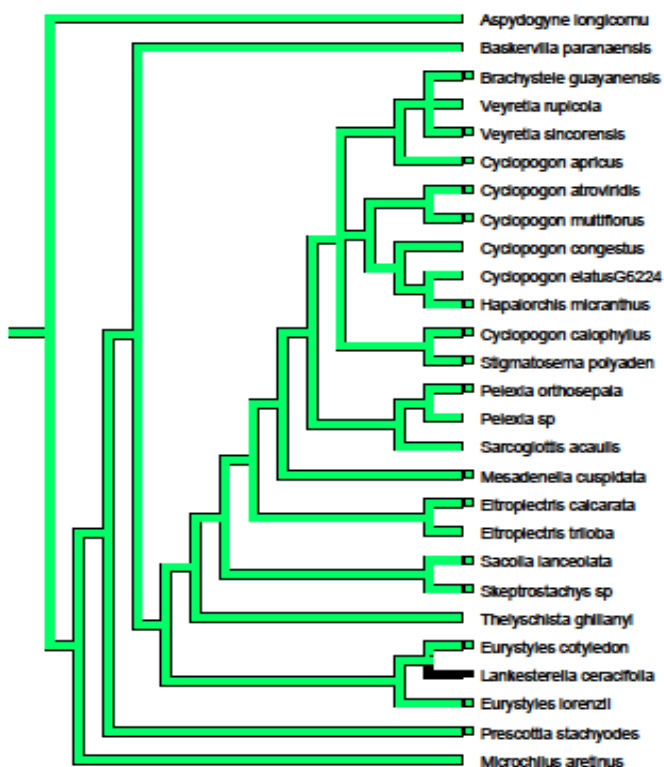


Figura 8- Otimização dos estados de caracteres na árvore de consenso estrito da análise de dados combinada. (A) tipo de tricomas da raiz (caracter 1) (IC = 0.333); (B) número de camadas do velame (caracter 3) (IC = 0.667).

■ espirantossoma
■ amido composto

A



□ cordiforme
■ em U
■ cilíndrico
■ alado
■ meia lua

B

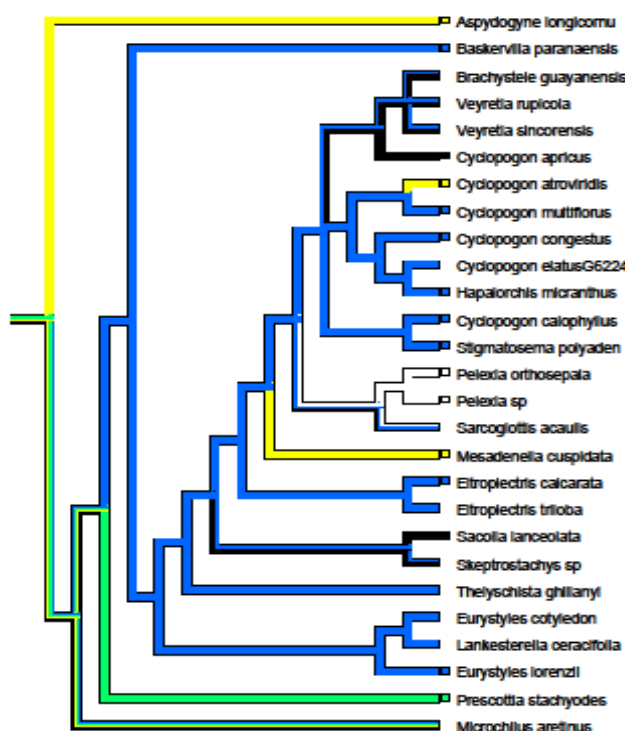
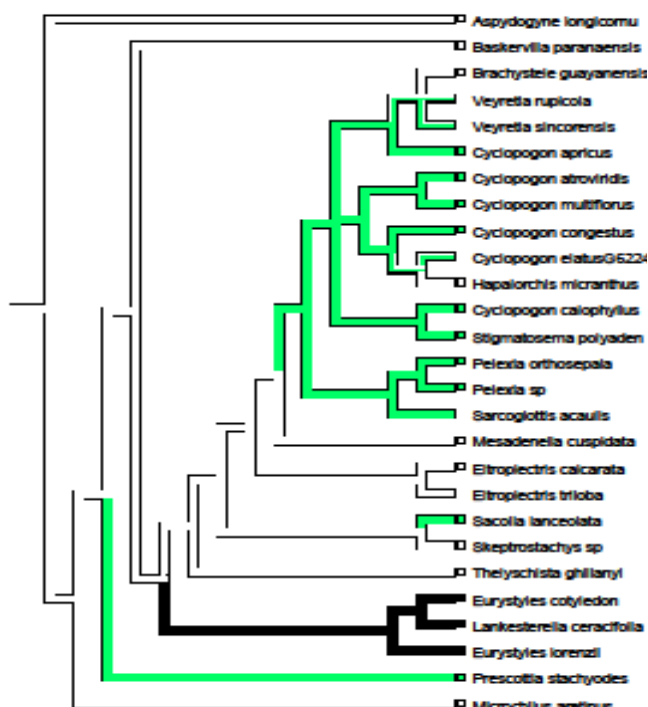


Figura 9- Otimização dos estados de caracteres na árvore de consenso estrito da análise de dados combinada. (C) tipo de amido (caracter 7) (IC = 1) ; (D) formato do pecíolo (caracter 11) (IC = 0.571, IR = 0.250).

lisa
 verrucosa
 estriada

A



Linear
 concavo convexa

B

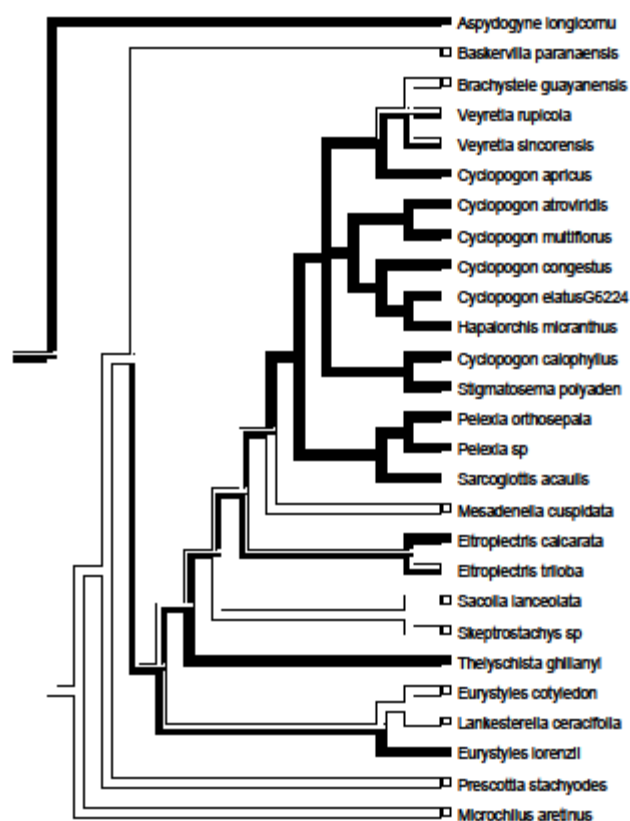


Figura 10- Otimização dos estados de caracteres na árvore de consenso estrito da análise de dados combinada. (A) tipo de cutícula (caracter 17) (IC = 0.333, IR = 0.600); (B) tipo da região da nervura central (caracter 27) (IC= 0.167, IR= 0.375).

REFERÊNCIAS

- Balogh P. 1982.** Generic redefinition in subtribe Spiranthinae (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **69**: 1119-32.
- Benzing DH, Ott DW, Friedman WE. 1982.** Roots of Sobralia Macrantha (orchidaceae): Structure and function of the velamen-exodermis complex. *American Journal of Botany* **69**: 608-614.
- Berlyn GP, Miksche JP. 1976.** *Botanical microtechnique and cytochemistry*. Ames, The Iowa State Press, p.326.
- Bremer K. 1988.** The limits of amino acid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstructions. *Evolution* **42**:795–803.
- Bukatsch F. 1972.** *Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau safranin*. Mikrokosmos. 8: vol. 61.
- Burns-Balogh P, Robinson H. 1983.** Evolution and phylogeny of the Pelexia alliance (Orchidaceae: Spiranthoideae: Spiranthinae). *Systematic botany* **8**: 263-268.
- Doyle J, Doyle J. 1987.** A rapid DNA isolation procedure for small amounts of leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**:810–815.
- Desfeux C, Maurice S, Henry JP, Lejeune B, Gouyon PH. 1996.** The evolution of reproductive system in the genus Silene. *Proceeding of the Royal Society of London* **263**: 409-414.
- Felsenstein J. 1985.** Confidence limits on phylogenies: an approach to using bootstrap. *Evolution* **39**:783–791.
- Fitch, WM. 1971.** Towards defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology* **20**: 406–416.
- Figueroa C, Salazar GA, Zavaleta HÁ, Engleman EM. 2008.** Root character evolution and systematics in Cranichidinae, Prescottiinae and Spiranthinae (Orchidaceae, Cranichideae) *Annals of Botany* **101**: 509-520.
- Goloboff P, Farris S, Nixon K. 2000.** TNT (Tree analysis using New Technology) (BETA) version 1.1. Published by the authors, Tucumán, Argentina
- Moreira ASFP, Isaias RMS. 2008.** Comparative Anatomy of the Absorption Roots of Terrestrial and Epiphytic Orchids. *Brazilian archives of biology and technology* **1**: p.83-93.
- Morris MW, Stern WL, FLS., JUDD WS. 1996.** Vegetative anatomy and systematics of subtribe Dendrobiinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **120**: 89–144.
- Page RDM. 2001.** Nexus Data Editor. <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/NDE.html>. Accessed 11Abril 2013.
- Porembski S & Barthlott. 1988.** Velamen radicum micromorphology and classification of the Orchidaceae. *Nordic Journal of Botany* **8**: 117-137.
- Pridgeon AM, Stern WL, Benzing DH. 1983.** Tilosomes in roots of orchidaceae: morphology and systematic occurrence. *American journal of botany* **70**: 1365-1377.
- Pridgeon AM, Cribb FF, Chase MW. 2003.** Rasmussen F. N. *Genera Orchidacearum* (volume3) Orchidoideae (part two) Vanillaideae Royal Botanic Gardens, Kew. Oxford.
- Salazar GA, Chase MW, Soto Arenas M A. 2003.** Ingrouille, M. Phylogenetics of Cranichideae with emphasis on Spiranthinae (Orchidaceae, Orchidoideae): Evidence from plastid and nuclear DNA sequences. *American Journal of Botany* **90**: 777-795.
- Sass JE. 1951.** *Botanical microtechnique*. 2a ed. The Iowa State College Press, p. 391.

- Scatena VL, Cardoso VA, Giulietti AM. 1999.** Morfo-anatomia de espécies de *Blastocaulon* Ruhland (Eriocaulaceae). *Acta Botanica Brasilica* **13**: 29-4.
- Szlachetko DL. 1995.** *Systema orchidacearum*- fragm. Flor. Geobot, Suppl **3**: 1-137.
- Stern WL, Aldrich HC, McDowell LM, Morris MW, Pridgeon AM. 1993a.** Amyloplasts from cortical root cells of Spirantheae (Orchidaceae). *Protoplasma* **172**: 49-55.
- Stern WL, Morris MW, Judd WS, Pridgeon AM, Dressler RL. 1993b.** Comparative vegetative anatomy and systematic of Spirantheae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **113**: 161-197.
- Stern WL, Carlswald BS. 2006.** Comparative vegetative anatomy and systematic of the Oncidiinae (Maxillarieae, Orchidaceae). *Botanical Journal of the Society*. **152**: 91-107.
- Swofford DL. 2003.** PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods).(Version 4). *Sinauer Associates, Sunderland*.
- Sun Y, Skinner DZ, Liang GH, Hulbert SH. 1994.** Phylogenetic analysis of *Sorghum* and related taxa using internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA. *Theoretical and Applied Genetics* **89**: 26-32.

APÊNDICES

APÊNDICE 1. Matriz morfológica construída com caracteres que foram utilizados na análise cladística de representatantes de Cranichideae (CAPÍTULO 1).....68

APÊNDICE 2. Matriz morfológica construída com caracteres que foram utilizados na análise cladística de representatantes de Cranichideae (CAPÍTULO 2).....69

APÊNDICE 1- MATRIZ MORFOLÓGICA
(CAPITULO 1)

Taxa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61			
<i>Prescottia stachyodes</i>	2	3	1	1	0	1	1	0	0	-	-	1	1	0	0+1+2	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	1	0	0	0	-	1	2	0	4		
<i>Cyclopogon apricus</i>	2	1	1	0	0	0	1	1	0	0	-	-	1+2	1+2	1	1+2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	3	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0+2	0	1	0	3			
<i>Mesadenella cuspidata</i>	2	1	1	1	0	1	1	3	0	0	-	-	0	0	0	1+2	0	1	0	0	1	0	0	0	1+3	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	-	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	1	0	0	1	1	1	0+2+4	0	2	0	0
<i>Sacoila lanceolata</i>	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	-	-	1+3	1+3	0	0+1	0	1	0	1	1	1	0	0	2	1	1	1	1	0	0	2	0	1	0	3+4	0	0	2	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0+1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Eurystyles actinosophila</i>	2	1	1	1	0	0	0	-	1	0	0	0	0	2	0	1+2	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	2	1	1	0	1	0	1	0+2	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0+4	0	2	1	2				
<i>Eurystyles cotyledon</i>	2	1	1	1	0	1	0	-	1	0	0	0	0	2	0	1+2	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	2	1	1	0	1	0	1	0+2	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0+4	0		1	2						
<i>Pseudoeurystyles Lorenzi</i>	2	2	?	0	0	1	1	2	0	1	-	-	2	2	0	1+2	0	1	1	0	2	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	1	0	0	3	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	-	1	1	0	0	0	0	-	1	1	1	1		
<i>Lankesterella caespitosa</i>	0	0	0	0	1	0	0	-	1	0	2	0	2	2	0	1+2	0	1	1	0	1	1	1+2	2+3+4	2+4	0	0	0	0	1	2	2	2+3	1	0	0	0+1+3	0	1	2+3	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	-	1	1	0	1	1	1	0+2+3+4	0	1	1	0	
<i>Lankesterella ceracifolia</i>	0	0	0	0	1	0	0	-	1	0	0	0	2	2	0	1+2	0	1	1	0	0	1	2+3+4	2+4	0	0	0	0	1	2	2	2+3	1	0	0	0+1+3	0	1	2+3	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	-	1	1	0	1	1	1	0+2+3+4	0	1	1	0		

APÊNDICE 2- MATRIZ MORFOLÓGICA (CAPITULO 2)

Taxa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	
<i>Aspydogyne longicornu</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	1	3	2	0	0	0	0	0	0	1+2	1	3	0	0	0	0	1	2	?	?	?	?	?	?	?
<i>Baskervilla paranaensis</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0+1+2	0	0	0	1	0	0	1	0	?	?	?	?	?	?	?
<i>Brachystele guayanensis</i>	1	0	0	0	-	1	1	1	1	?	?	?	0	0	0	0	0	0	1+2	1	2	2	2	1	0+2	1	0	0	0	0	1	0	0	
<i>Cyclopogon apricus</i>	2	0	0	1	0	0	1	1	1	1	4	1	0	0	0	1	1	1	1+2	2	1	0	2	1	0	1	2	0	0	1	1	0	0	
<i>Cyclopogon atroviridis</i>	2	0	0	1	0	1	1	1	0	1	3	0	0	0	0	0	1	0	1+2	0	0	0	1	0	0	1	2	0	0	1	1	0	0	
<i>Cyclopogon calophyllus</i>	2	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1+2	0	0	0	1	0	0	1	2	0	0	1	1	0	0	
<i>Cyclopogon congestus</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1+2	0	0	0	0	0	0	1	2	?	?	?	?	?	?	
<i>Cyclopogon elatus</i> G6224	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	0	1	1	0	0	
<i>Cyclopogon multiflorus</i>	2	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1+2	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	1	1	0	0	
<i>Eltroplectris calcarata</i>	2	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1+2	0	1	0	1	0	0	1	2	0	0	0	1	0	0	
<i>Eltroplectris triloba</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	0	0	1	0	0	
<i>Eurystyles cotyledon</i>	2	0	0	1	0	1	1	0	1	0	-	-	0	1	0	0	2	0	1+2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	
<i>Eurystyles lorenzii</i>	2	0	1	?	?	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	2	2	0	1+2	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	1	0	1	
<i>Hapalorchis micranthus</i>	2	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1+2	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	1	1	0	0	
<i>Lankesterella ceracifolia</i>	1	1	0	0	-	0	2	0	0	0	-	-	0	1	0	2	2	0	1+2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	0+1	0	1	
<i>Mesadenella cuspidata</i>	2	0	0	1	0	1	1	1	1	1	3	1	0	0	0	0	0	0	1+2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	
<i>Microchilus aretinus</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	0	0	0	0	0	0+1	0	3	0	1	0	0	1	0	0	0	1+2	1	1	0	
<i>Pelexia orthosepala</i>	1	0	0	?	?	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0+1	0	2	0	0	0	0+1	1	2	0	0	1	1	0	0	
<i>Pelexia sp</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1+2	1	1	0	0	0	0	1	2	0	0	1	1	0	0	
<i>Prescottia stachyodes</i>	2	0	2	1	0	1	1	0	1	1	2	2	0	0	0	1	1	0	0+1+2	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	
<i>Sacoila lanceolata</i>	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	4	2	0	0	0	1	1	0	1+2	0	0	0	1	0	0	1	0	?	?	?	?	?	?	
<i>Sarcoglottis acaulis</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	0	1	1	0	0	
<i>Skeptrostachys sp</i>	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	-	?	0	0	0	0	0	1	1+2	0	0	1	2	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	
<i>Stigmatosema polyaden</i>	2	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1+2	0	0	0	1	0	0	1	2	0	0	0	1	0	0	
<i>Thelyschista ghillanyi</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	0	0	1	0	0	1+2	0	0	2	1	0	0	1	2	?	?	?	?	?	?	
<i>Veyretia rupicola</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	1	0	1	1	0	
<i>V. sincorensis</i>	0	0	0	1	0	1	1	2	1	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	1	0	1	1	0	

